



Universidad  
de Cádiz

Facultad de Ciencias

**CURSO 2018 - 2019**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN  
BIOTECNOLOGÍA**

# Estudio de la bioacumulación metálica en la seta de interés gastronómico *Lactarius deliciosus*



**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**AUTORA: Dña. Marta Barea Sepúlveda**

**TUTORES ACADÉMICOS:**

**Dra. Dña. Estrella Espada Bellido**

**Dr. D. Gerardo Fernández Barbero**





---

# **Estudio de la bioacumulación metálica en la seta de interés gastronómico *Lactarius deliciosus***

---

TRABAJO FIN DE MÁSTER

realizado en la

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

Memoria del Trabajo Fin de Máster presentada por la alumna Dña. Marta Barea Sepúlveda, para optar al título de Máster Universitario en Biotecnología.

Puerto Real, a 19 de septiembre de 2019

Fdo.: Marta Barea Sepúlveda



**Dra. Dña. Estrella Espada Bellido y Dr. D. Gerardo Fernández Barbero**, profesores del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz.

**HACEN CONSTAR:**

Que el Trabajo Fin de Máster titulado **“Estudio de la bioacumulación metálica en la seta de interés gastronómico *Lactarius deliciosus*”**, constituye la memoria que presenta Dña. Marta Barea Sepúlveda para optar al título de Máster Universitario en Biotecnología y ha sido realizado bajo su tutorización.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación

En Puerto Real, a 19 de septiembre de 2019

Fdo.: Dra. Dña. Estrella Espada Bellido

Fdo.: Dr. D. Gerardo Fernández Barbero



MARTA BAREA SEPÚLVEDA

**Estudio de la bioacumulación metálica en la seta de  
interés gastronómico *Lactarius deliciosus***

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA

2018-2019



*1ª edición, septiembre de 2019*

*1ª impresión, septiembre de 2019*

*Esta obra se encuentra sujeta a licencia de derechos de autor Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada (CC BY-NC-ND). No se permite la generación de obras derivadas ni hacer un uso comercial de la obra original, es decir, sólo son posibles los usos y finalidades que no tengan carácter comercial. Puede acceder a los términos de la licencia de Creative Commons a través de la web (<https://creativecommons.org/>).*

La imagen empleada para el diseño de la portada ha sido cedida por **La Casa de las Setas** y recuperada a través de su web (<https://lacasadelassetas.com/>).

*Hecho e impreso en España – Made and printed in Spain*





*“A todas las mujeres que han formado y forman parte de  
la comunidad científica y su labor ha sido invisibilizada.”*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a mis tutores *Estrella y Gerardo* el haberme brindado la oportunidad de iniciar esta línea de investigación en la que tenemos puestas tantas ganas e ilusión. Especialmente, agradezco que hayáis volcado vuestra confianza en mí y que hayáis hecho todo lo que ha estado a vuestro alcance para proporcionarme todos los recursos que he necesitado. Durante este período a vuestro lado he ido entendiendo lo que significa ser realmente una investigadora, puesto que cada día me habéis ido enseñando que la investigación es un estilo de vida que, pese a necesitar un alto nivel de sacrificio, te lleva a conocer lo que ocurre a nuestro alrededor y esa, para una mente científica y curiosa, es la mayor satisfacción. *Gracias a ambos*, por haberme animado a no desistir y a luchar por las metas que uno quiere alcanzar.

En segundo lugar, me gustaría dar las gracias a una persona que indiscutiblemente ha sido protagonista de este año de trabajo: *Antonio Benítez*. Gracias por tu paciencia, explicaciones y horas en ICP-MS para que todo el análisis del contenido metálico en setas y suelos saliera bien. Gracias por haber dejado que me desarrolle como química en tu laboratorio y, sobre todo, por haber confiado en mí y haberme dado autonomía a la hora de trabajar.

Por otro lado, también tengo que agradecer a nuestros alumnos colaboradores, *Saulo y Andrés*, el haber sido un apoyo importante en los momentos de más tensión de la investigación, así como a *Marta Ferreira*, por haber ayudado en las correcciones del estudio estadístico y tratamiento quimiométrico de los datos.

Agradecer también al Departamento de Química Analítica, a los Servicios Centrales de Investigación Científica y Tecnológica (SC-ICyT) y al Instituto de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria (IVAGRO) el haberme permitido emplear sus instalaciones y equipos para desarrollar el proceso experimental de este proyecto, así como a la Asociación Micológica del Estrecho Mairei, a la Universidad Abdelmalek Essaadi (Marruecos) y al grupo AGR-122 por su colaboración en esta investigación.

El recorrido durante este año de Máster ha sido duro e intenso, por lo que todo este trabajo de investigación no habría sido posible sin las personas que fuera de la Universidad también han estado día a día apoyándome y no dejando que tirase la toalla. Por ello, me gustaría dar las gracias:

A mis amigas/os de la carrera, *Marta C., Pablo F., Mamen G. e Isa S.*, que llevan conmigo desde el inicio de esta aventura cuando decidí ser química y que siguen todavía a mi lado.

A *Joseca C., Maenia A., Chema R., Gema F. y Enrique P.* por haber sido una vía de escape del Máster y haber aguantado a “Marta Fungi” hablando de sus setas alguna que otra noche.

A mis abuelos y abuelas, las que están y los que se marcharon. Porque cada uno de ellos siempre ha querido que fuera feliz y que luchara por mis sueños. Pero especialmente a mi abuela *Trini*, por la de

veces que no he podido ir durante este año a Córdoba a verla porque he pasado los días encerrada en el laboratorio o de clase en clase. Sé que estás muy orgullosa de mí por todo lo que he ido logrando a lo largo de estos años, pero más orgullosa estoy yo de ti por lo luchadora, valiente y fuerte que has sido cada día de tu vida. Gracias por preocuparte siempre.

A *José*, por haber aparecido en mi vida de forma espontánea y haber puesto orden en medio de todo el caos. Eres el mejor compañero de vida que podría tener para emprender este viaje. Gracias por tu comprensión, apoyo y cariño cada día, y por ser una fuente de inspiración y nuevas ideas.

Finalmente, tengo que agradecer a las personas sin las cuales yo no podría haber llegado al punto en el que me encuentro. ***A mis padres***, *Rosario María Sepúlveda* y *Manuel Ángel Barea*. Estas líneas no son suficientes para agradecer todos los esfuerzos que habéis hecho a lo largo de vuestra vida para darme lo mejor. Cada uno de los pasos que he ido dando en mi vida no habrían sido posibles sin vosotros a mi lado. Este trabajo es gracias a los dos, las personas que más me apoyan, me animan, me aconsejan y se alegran por mí. Gracias por haberme dejado perseguir mis sueños y nunca haberme puesto límites. Gracias, sobre todo, por seguir animándome a continuar mi carrera investigadora y por sentirnos orgullosos de mí.

<<En la vida no debe temerse nada,  
todo debe comprenderse.>>

MARIE CURIE



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>PREFACIO</b> .....	I
<b>1. RESUMEN</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	2
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
3.1. Aspectos generales .....	3
3.1.1. Importancia de las setas a lo largo de la historia .....	3
3.1.2. Términos micológicos .....	4
3.1.3. Composición nutricional de las setas .....	5
3.2. Metales pesados .....	5
3.2.1. Toxicidad de los metales pesados.....	5
3.3. Bioacumulación de metales pesados en setas.....	7
3.3.1. Factores que afectan a la bioacumulación metálica en setas .....	8
3.4. Antecedentes bibliográficos .....	8
3.4.1. Áreas geográficas estudiadas.....	8
3.4.2. Especies de setas estudiadas.....	9
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	11
<b>5. MATERIALES Y MÉTODO</b> .....	12
5.1. Materiales.....	12
5.1.1. Material biológico empleado y localizaciones geográficas .....	12
5.1.2. Reactivos .....	13
5.1.3. Material de referencia certificado (MRC) .....	13
5.1.4. Patrones de calibración para ICP-MS.....	14
5.2. Instrumentación y equipos .....	14
5.2.1. Bloque digestor.....	14
5.2.2. Espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) .....	14
5.3. Softwares.....	15
5.4. Procedimiento experimental.....	15
5.4.1. Elección de la técnica de análisis .....	15
5.4.1.1. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).....	15
5.4.2. Toma de muestras.....	17
5.4.3. Preparación y tratamiento de las muestras .....	17
5.4.4. Digestión ácida de la muestra.....	18
5.4.4.1. Optimización del método de digestión para muestras de setas .....	20
5.4.4.2. Método de digestión para muestras de suelos .....	22
5.4.5. Análisis.....	22

5.4.5.1. Determinación del contenido metálico.....	22
5.4.5.2. Medida del pH.....	25
5.4.5.3. Determinación del porcentaje de materia orgánica .....	25
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
6.1. Propiedades del suelo y contenido metálico.....	26
6.1.1. Similitud en cuanto a Cu, Zn, Pb y Cr en las muestras de suelos.....	28
6.1.2. Procedencia del contenido metálico en muestras de suelos .....	30
6.1.3. Evaluación de los niveles de contaminación .....	31
6.2. Estudio de la bioacumulación metálica en <i>Lactarius deliciosus</i> .....	32
6.2.1. Contenido metálico en <i>Lactarius deliciosus</i> .....	33
6.2.2. Comparativa del contenido metálico entre éste y otros estudios.....	35
6.2.3. Factores de bioconcentración .....	36
6.3. Ingesta diaria estimada: Beneficios y riesgos.....	38
6.3.1. Ingesta diaria estimada en adultos.....	38
6.3.2. Ingesta diaria estimada en niños.....	40
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>8. PERSPECTIVAS DE FUTURO .....</b>	<b>44</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>
<b>10. APÉNDICES.....</b>	<b>a</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Pintura mural de la cámara funeraria del faraón Amenemhet (1500-1450 a.C.) .....	3
<b>Figura 2.</b> (a) Esquema de la agrupación de las hifas para formar el micelio; (b) Esquema de las partes generales de una seta .....	4
<b>Figura 3.</b> Respuesta de los organismos en función de la concentración de metales (a) esenciales y (b) no esenciales.....	6
<b>Figura 4.</b> Representación de los procesos de bioacumulación y de biomagnificación de metales a lo largo de la cadena trófica. Los cuadros en color naranja representan el incremento de la concentración del contaminante. ....	7
<b>Figura 5.</b> Imagen de <i>Lactarius deliciosus</i> cedida por la Asociación Micológica Mairei .....	10
<b>Figura 6.</b> Mapa de las localizaciones muestreadas del sur de España y norte de Marruecos. C-1: Dehesa de las Yeguas; C-2: Jimena de la Frontera; C-3: El Palancar; C-4: El Colorado; C-5: Pinar del Rey; M-1: Chefchaouen; M-2: Bouhachem.....	12
<b>Figura 7.</b> Bloque digestor DigiPrep Jr de SCP Science .....	14
<b>Figura 8.</b> Equipo ICP-MS Modelo Serie XII de Thermo Elemental.....	14
<b>Figura 9.</b> Esquema de los componentes básicos de un ICP-MS.....	16
<b>Figura 10.</b> Imágenes tomadas durante la optimización del método de digestión de setas con bloque digestor .....	21
<b>Figura 11.</b> Esquema del método de digestión ácida para setas.....	22
<b>Figura 12.</b> Gráfico de barras de las concentraciones metálicas de los suelos de las distintas localizaciones geográficas estudiadas .....	27
<b>Figura 13.</b> Diagrama de cajas y bigotes para el contenido en $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de cromo, cobre, zinc y plomo en suelos.....	28
<b>Figura 14.</b> Dendrograma para el contenido metálico en suelos de fructificación .....	29
<b>Figura 15.</b> Gráfico Biplot obtenido en el análisis de componentes principales (ACP).....	30
<b>Figura 16.</b> Gráfico de barras del contenido metálico en muestras de <i>Lactarius deliciosus</i> . A la izquierda se representa el contenido de metales no esenciales en las muestras y a la derecha el contenido de metales esenciales.....	34
<b>Figura A1.</b> Gráfico de influencias obtenido en el análisis de componentes principales (ACP).....	h



## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Reactivos comerciales empleados .....	13
<b>Tabla 2.</b> Revisión bibliográfica sobre el empleo de bloque digestor en matrices orgánicas de origen vegetal .....	20
<b>Tabla 3.</b> Experiencias del diseño univariante de volúmenes de ácidos y recuperaciones (%) obtenidas para cada metal.....	21
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de medida y configuración del ICP-MS Serie XII de Thermo Elemental.....	23
<b>Tabla 5.</b> Concentraciones de los patrones de calibración ( $\mu\text{g/L}$ ) para determinación de metales en <i>Lactarius deliciosus</i> .....	24
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones de los patrones de calibración ( $\mu\text{g/L}$ ) para determinación de metales en suelos de fructificación.....	24
<b>Tabla 7.</b> LD y LC ( $\text{mg/kg}$ ) de <i>Lactarius deliciosus</i> y suelos referidos a peso de muestra y volumen de disolución para cada uno de los isótopos de los analitos medidos por ICP-MS.....	25
<b>Tabla 8.</b> Valores medios del contenido metálico en suelos ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de materia seca, $n = 3$ ) y propiedades fisicoquímicas (pH y contenido de materia orgánica).....	26
<b>Tabla 9.</b> Resumen estadístico del análisis de una variable para cada metal en suelos, donde se muestra el promedio, la desviación estándar (s.d.), el coeficiente de variación (%) y el sesgo y la curtosis estandarizada. Los valores han sido obtenidos considerando un nivel de confianza del 95%.....	27
<b>Tabla 10.</b> Coeficientes de correlación y $p$ -valor obtenidos en el análisis de regresión lineal simple en suelos. Los valores han sido obtenidos considerando un nivel de confianza del 95%.....	31
<b>Tabla 11.</b> Comparación de las concentraciones medias experimentales en suelos con los límites máximos permitidos para Cu, Zn, Cr y Pb .....	32
<b>Tabla 12.</b> Valores medios del contenido metálico en <i>Lactarius deliciosus</i> ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso seco) con sus desviaciones estándar ( $n = 3$ ).....	33
<b>Tabla 13.</b> Resumen estadístico del análisis de una variable para cada metal en muestras de <i>Lactarius deliciosus</i> , donde se muestra el promedio, la desviación estándar (s.d.), el coeficiente de variación (%) y el sesgo y la curtosis estandarizada. Los valores han sido obtenidos considerando un nivel de confianza del 95%.....	33
<b>Tabla 14.</b> Factores de bioconcentración para las muestras de <i>L. deliciosus</i> . Los resultados en rojo indican que la muestra de <i>L. deliciosus</i> es bioacumuladora para el metal ( $\text{BCF} > 1$ ).....	36

<b>Tabla 15.</b> Coeficientes de correlación obtenidos en el análisis de regresión lineal simple para contenido metálico en setas y suelos y factores fisicoquímicos. Los valores han sido obtenidos considerando un nivel de confianza del 95% .....	37
<b>Tabla 16.</b> <i>p</i> -valor obtenidos en el análisis de regresión lineal simple para contenido metálico en setas y suelos y factores fisicoquímicos. Los valores han sido obtenidos considerando un nivel de confianza del 95%.....	37
<b>Tabla 17.</b> Estimación de la ingesta diaria de Cu, Zn, Cr y Pb mediante el consumo de 300 gramos de níscales por parte de un consumidor de masa corporal media de 60 kg .....	39
<b>Tabla 18.</b> Estimación de la ingesta diaria de Cu, Zn, Cr y Pb mediante el consumo de 300 gramos de níscales por parte de un consumidor de masa corporal media de 15 kg .....	40
<b>Tabla A1.</b> Muestras de <i>Lactarius deliciosus</i> y suelos .....	e
<b>Tabla A2.</b> Matriz de correlación del análisis de componentes principales (ACP) .....	h

## ABREVIATURAS

---

**AC:** Análisis de clúster jerárquico.

**ACP:** Análisis por componentes principales.

**AESAN:** Agencia Española de Salud Alimentaria y Nutrición.

**BCF:** Factor de bioconcentración.

**CCT:** Celda de reacción colisión.

**EAA:** Espectroscopía de absorción atómica con llama.

**EDIM:** Ingesta diaria estimada de metales.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

**IARC:** Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer.

**ICP:** Plasma de acoplamiento inductivo.

**ICP-MS:** Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

**ICP-AES:** Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.

**KED:** Discriminación de energía.

**LD:** Límite de detección.

**LC:** Límite de cuantificación.

**M.O.:** Materia orgánica.

**MRC:** Material de referencia certificado.

**MS:** Espectrometría de masas.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PC1:** Componente principal 1.

**PC2:** Componente principal 2.

**PFA:** Politetrafluoroetileno.

**PS:** Plasma screen.

**RF:** Radiofrecuencias.

**SC-ICyT:** Servicios Centrales de Investigación Científica y Tecnológica.

**s.d.:** Desviación estándar

**UE:** Unión Europea.



## PREFACIO

<<Comer es una necesidad, pero comer de  
forma inteligente es un arte.>>

FRANÇOIS DE LA ROCHEFOUCAULD

<<Que tu alimento sea tu medicina, y  
tu medicina sea tu alimento.>>

HIPÓCRATES

La relación existente entre alimentación y salud es conocida desde tiempos de Hipócrates. Sin embargo, no ha sido hasta hace relativamente poco cuando se ha establecido una relación entre el desarrollo de ciertas enfermedades como, por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares, y ciertos aspectos de la composición de los alimentos ingeridos.

El ritmo de vida sedentaria y cómoda que hemos ido desarrollando, así como el abuso de productos ultra procesados, ha desembocado en un incremento de enfermedades relacionadas con el estilo de vida. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que, únicamente buscando opciones más nutritivas se podrán asentar unas bases saludables para nuestro organismo que permitan prevenir el desarrollo de determinadas enfermedades. De esta forma, surge la necesidad de desarrollar estudios acerca de los procesos químicos y las interacciones de todos los componentes de los alimentos. Esta demanda ha llevado a que la Tecnología de los Alimentos sea un campo prioritario de estudio e investigación científica.

Desde la Química y la Biotecnología se llevan a cabo investigaciones para determinar la composición, propiedades y procesos de las sustancias que componen los alimentos. Junto con otras áreas de la ciencia, también estudian otros aspectos relacionados con el comportamiento de éstas durante el almacenamiento, procesado y cocinado, por lo que la sinergia entre la Química y la Biotecnología, aplicadas al campo de la Tecnología de los Alimentos, permite crear conciencia a la hora de practicar hábitos saludables en lo referente a la alimentación, ya que sus propósitos y resultados están al alcance de todos.





## 1. RESUMEN

El consumo de setas comestibles, tanto cultivadas como silvestres, ha aumentado considerablemente en los últimos años según la Agencia Española de Salud Alimentaria y Nutrición (AESAN) debido a las propiedades beneficiosas que éstas pueden aportar al organismo, destacando su poder antioxidante, gracias a su composición rica en compuestos fenólicos, y a su carácter nutricional, puesto que son fuentes de vitaminas, proteínas, aminoácidos y fibras. Sin embargo, las setas son capaces de asimilar y acumular metales del medio ambiente llegando a alcanzar concentraciones más altas que las del propio medio en el que se encuentran. De esta forma, el consumo de setas con altos contenidos en metales puede representar una importante vía de entrada al cuerpo humano, con las consiguientes implicaciones en la salud que esto conlleva.

Así pues, debido al creciente interés por las setas y al mayor consumo de éstas a nivel nacional, en este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la bioacumulación de metales esenciales (cobre y zinc) y no esenciales (cromo y plomo) en siete muestras de la especie de alto interés gastronómico *Lactarius deliciosus* (níscolo) procedentes de distintas localizaciones del sur de España y norte de Marruecos.

La cuantificación del contenido total de estos cuatro metales, tanto en muestras de *Lactarius deliciosus* como en los suelos donde fructificaron, tuvo lugar llevando a cabo la digestión ácida de las muestras con bloque digestor y empleando la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) como técnica de análisis. Por su parte, la evaluación de la capacidad bioacumuladora de la especie *Lactarius deliciosus* se llevó a cabo mediante el cálculo de factores de bioconcentración (BCF).

Los resultados obtenidos en esta investigación han demostrado que las áreas geográficas muestreadas no presentan contaminación por plomo, cromo, cobre y zinc. Por otro lado, las concentraciones de plomo, cromo y cobre en esta especie de seta se han encontrado por debajo de las reportadas por otros estudios llevados a cabo en España. A su vez, el contenido en zinc se ha hallado en el rango de los niveles observados en investigaciones anteriores de otros autores españoles. Los factores de bioconcentración sugieren que, coincidiendo con la bibliografía, la especie *Lactarius deliciosus* es bioacumuladora ( $BCF > 1$ ) para zinc y cobre y bioexcluyente ( $BCF < 1$ ) para plomo y cromo, revelándose que tanto los factores físicoquímicos del suelo (pH y contenido de materia orgánica) como los factores intrínsecos de la especie parecen afectar a la acumulación de metales pesados.

Finalmente, a modo de información adicional para los consumidores de setas, se realizó un estudio de los beneficios y riesgos que puede suponer el consumo de níscolos (*Lactarius deliciosus*) procedentes de las localizaciones estudiadas del sur de España y norte de Marruecos. Este estudio ha concluido en que el consumo de estas setas no parece presentar riesgos para la salud de los adultos. Sin embargo, el aporte de oligoelementos por parte de éstas no llega a cubrir los requerimientos diarios.

## 2. ABSTRACT

Edible mushrooms consumption (cultivated and wild) has increased considerably in recent years according to the Spanish Agency of Food and Nutrition (AESAN) due to the beneficial properties that these can bring to the body, highlighting its antioxidant power, thanks to its composition rich in phenolic compounds, and its nutritional character, as they are sources of vitamins, proteins, amino acids and fibers. Nevertheless, mushrooms are capable of assimilating and accumulating metals from the environment, reaching higher concentrations than those of the soil. In this way, the consumption of mushrooms with high content in metals can represent an important entry way to the human body, with the consequent implications on health. Thus, due to the growing interest in mushrooms and the greater consumption of these at national level, this work has carried out the study of the bioaccumulation of essential metals (copper and zinc) and non-essential metals (chromium and lead) in seven samples of the species of high gastronomic interest *Lactarius deliciosus* (saffron milk cap mushroom) from different locations in southern Spain and northern Morocco.

The quantification of the total content of these four metals, both in samples of *Lactarius deliciosus* and in soils, took place by carrying out the acid digestion of the samples with a digester block and using mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS) as analysis technique. The evaluation of the bioaccumulatory capacity of the species *Lactarius deliciosus* was performed by calculating the bioconcentration factors (BCF).

The results obtained in this investigation have demonstrated that the sampled geographical areas do not present lead, chromium, copper, and zinc contamination. On the other hand, the concentrations of lead, chromium and copper in this species of mushroom have been lower than those reported by other studies carried out in Spain. At the same time, zinc content has been found in the range of the levels observed in previous investigations of other Spanish authors. The bioconcentration factors suggest that, coinciding with the bibliography, the species *Lactarius deliciosus* is a bioaccumulator ( $BCF > 1$ ) for zinc and copper and a bioexcluser ( $BCF < 1$ ) for lead and chromium, revealing that both the physicochemical factors of the soil (pH and organic matter content) and the intrinsic factors of the species seem to affect the accumulation of heavy metals.

Finally, as additional information for mushrooms consumers, a study of the benefits and risks that may involve the consumption of *Lactarius deliciosus* from southern Spain and northern Morocco was performed. This study has concluded that the consumption of the mushrooms studied does not represent risks to the health of adults. However, the contribution of trace essential elements by these mushrooms does not meet the daily requirements.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Aspectos generales

##### 3.1.1. Importancia de las setas a lo largo de la historia

En los últimos años, la demanda e interés por las setas ha aumentado entre los consumidores como resultado de una mayor concienciación por incluir opciones más nutritivas que permitan poner en práctica dietas más saludables. Aunque tradicionalmente las setas eran consumidas por su palatabilidad, los avances en el ámbito científico han llevado a que en la actualidad su uso gastronómico presente un enfoque más nutricional. Las recientes investigaciones acerca de sus propiedades apuntan a que su introducción en la dieta influye en el control y modulación de diversas funciones del cuerpo y, en consecuencia, participan en la reducción del riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares, hipertensión, cáncer, Parkinson y Alzheimer <sup>1,2</sup>.

Pese a que la incorporación de las setas en la dieta esté en auge hoy en día, las setas y los seres humanos han estado relacionados desde tiempos remotos, pues el consumo de este grupo de seres vivos de formas y colores tan diversos comenzó con las primeras sociedades cazadoras-recolectoras del Paleolítico y Neolítico, de las que se tiene constancia que incluían en su alimentación varias especies de setas (*Fistulina hepatica* y diversos boletos) <sup>4</sup>.

No obstante, la descripción más antigua que conocemos acerca del uso de las setas la hallamos en la literatura védica (1200 a.C., aproximadamente) donde los hindúes las consideraban como *Soma*, dios de la Luna, el cual representaba el elixir de la inmortalidad <sup>5,6</sup>. Al igual que en la cultura hindú, en el antiguo Egipto las setas fueron consideradas una fuente de inmortalidad por ser un alimento de dioses, por lo que su consumo y uso estaba restringido de forma exclusiva a los miembros de la realeza. Así pues, podrían haber sido utilizadas

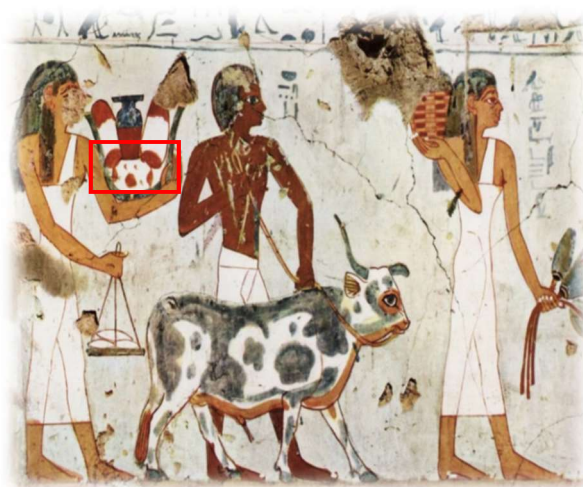


Figura 1. Pintura mural de la cámara funeraria del faraón Amenemhet (1500-1450 a.C.) <sup>3</sup>.

en rituales y con fines curativos como demuestra la pintura mural de la cámara funeraria del faraón de la XII dinastía Amenemhet (Figura 1), datada entre el 1500 a.C. y el 1450 a.C. <sup>5,6</sup>.

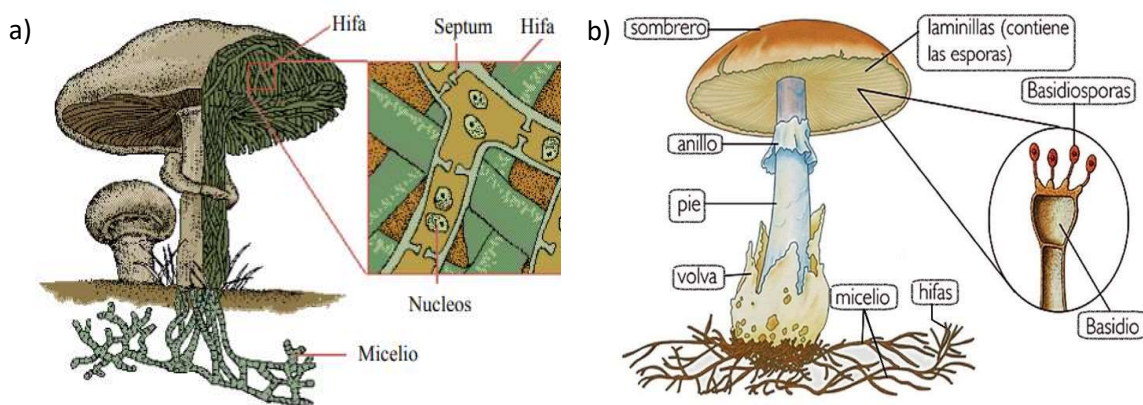
En el Imperio Romano, las setas comenzaron a consumirse de forma habitual en la alta sociedad, ya que sus sabores únicos, aromas y texturas hacían de estas un manjar. Es así que en los frescos de Herculano aparece pintada una de las setas comestibles más consumida y conocida en la actualidad, el níscalo (*Lactarius deliciosus*) <sup>4-6</sup>. Era tal el gusto por este producto que durante el mandato del

emperador Tiberio, uno de los maestros de la cocina romana más importantes, Marco Gavio Apicio, dedicó un apartado en sus tratados gastronómicos a algunas recetas culinarias para consumir setas, trufas y criadillas de tierras <sup>4</sup>.

De esta forma, durante miles de años, las setas han formado parte de la historia de la especie humana no sólo por sus cualidades gastronómicas, sino también por sus usos medicinales y como parte de la mitología y leyendas.

### 3.1.2. Términos micológicos

Las setas son el cuerpo fructífero, o esporocarpos, de un conjunto de hongos pluricelulares clasificados en la división *Basidiomycota* <sup>2,7</sup>. La fructificación de estos hongos basidiomicetos tiene lugar a partir de las hifas maduras, que son talos filamentosos cuyo conjunto constituye el micelio que penetra en el suelo (Figura 2: a) <sup>8</sup>. Las especies de hongos de esta división pueden ser saprófitas, parasitarias o micorrícicas en su ecología <sup>9</sup>, y, debido a su complejidad anatómica y reproductiva, los basidiomicetos son considerados como los hongos más evolucionados hasta el momento. Actualmente, existen más de 12.000 especies de hongos en la naturaleza que producen cuerpos fructíferos, pero sólo alrededor de 25 de ellas son mundialmente aceptadas como comestibles y únicamente unas pocas son cultivadas y comercializadas <sup>1,7</sup>. A pesar de que encontramos una gran diversidad de formas, tamaños y colores en función de la especie, una mayor parte de los cuerpos fructíferos de los basidiomicetos presentan una estructura común en la que destacan dos partes básicas: el sombrero y el pie (Figura 2: b).



**Figura 2.** (a) Esquema de la agrupación de las hifas para formar el micelio <sup>7</sup>; (b) Esquema de las partes generales de una seta. Fuente: (b) <https://www.partesdel.com/seta.html>

La parte exterior del sombrero está recubierta por una cutícula que puede ser de diferentes colores, siendo los más comunes el blanco, crema, naranja, marrón, morado y varios tonos de rojo <sup>7</sup>. A su vez, esta parte externa puede ser lisa o presentar verrugas o pequeñas escamas, por lo que el color y la morfología del sombrero son de gran relevancia a la hora de clasificar la seta. Debajo del sombrero se encuentra el himenio, que se compone de laminillas, pliegues o tubos formados por millones de basidios microscópicos donde se producen las basidiosporas <sup>7,10</sup>. La mayoría de las setas presentan un anillo

cuando son jóvenes, el cual puede encontrarse localizado en el pie del cuerpo fructífero. Este anillo son los restos de cutículas que mantenían el himenio cerrado y protegido durante su desarrollo y que se rompe cuando las esporas están maduras y listas para su dispersión <sup>7,10</sup>. En la base del pie de algunas setas, como las de la especie *Amanita*, se puede distinguir la volva que constituye una estructura de protección temporal durante el desarrollo del cuerpo fructífero <sup>7,10</sup>.

### 3.1.3. Composición nutricional de las setas

A pesar de que es sabido que las setas no se encuentran clasificadas dentro del reino de las plantas, puesto que pertenecen a su propio reino, el de los hongos, en el mundo de la alimentación se las engloba dentro de los vegetales y hortalizas. Entre los beneficios que las setas pueden aportar al organismo destaca su poder antioxidante y propiedades antiinflamatorias debido a su composición rica en compuesto fenólicos, ácidos orgánicos, carotenoides, terpenos, polisacáridos y esteroides <sup>11</sup>. Por otro lado, las setas presentan un alto contenido en vitaminas, carbohidratos, proteínas, aminoácidos esenciales, fibras y minerales, así como un bajo contenido en grasas <sup>2,5,12-15</sup>. Sin embargo, tienen la capacidad de acumular un alto nivel de metales pesados a través del sustrato en las distintas partes que la componen: pie y sombrero <sup>8,16</sup>. Aunque es cierto que los seres vivos requieren de determinados metales como macronutrientes, existen ciertas formas de algunos metales que, incluso en cantidades relativamente bajas, pueden ser tóxicos y llegar a repercutir en la salud de los consumidores <sup>17</sup>.

## 3.2. Metales pesados

El término metal pesado hace referencia a todo elemento químico metálico que presenta una densidad relativamente alta respecto al agua, pudiendo ser tóxicos a bajas concentraciones <sup>12</sup>. La presencia de concentraciones nocivas de metales pesados en el suelo, el aire y el agua es un importante problema dado sus efectos perjudiciales para el ser humano, por lo que su eliminación se considera clave para la protección de la salud pública. Debido a su alto grado de persistencia en el medio y a su tendencia a bioacumularse en la cadena trófica, y en ciertos casos, a su elevada toxicidad incluso a concentraciones bajas, los metales pesados son considerados como unos de los contaminantes ambientales más peligrosos <sup>5,17</sup>.

### 3.2.1. Toxicidad de los metales pesados

Es sabido que los metales como el cobalto (Co), el cobre (Cu), el hierro (Fe), el magnesio (Mg), el molibdeno (Mo), el selenio (Se) y el zinc (Zn) son nutrientes esenciales para distintas funciones fisiológicas en el organismo, por lo que la ausencia de alguno de ellos podría repercutir en determinados procesos biológicos comprometiendo la salud. Sin embargo, otros metales como el mercurio (Hg), el níquel (Ni), la plata (Ag), el plomo (Pb), el cadmio (Cd), el arsénico ( $\text{As}^{3+}$ ) y el cromo ( $\text{Cr}^{6+}$ ) no presentan funciones biológicas dentro del organismo, por lo que se consideran metales no esenciales <sup>12</sup>. La superación de los niveles máximos permitidos de todos los metales (Figura 3), tanto esenciales como

no esenciales, puede afectar al metabolismo normal de un organismo, puesto que pueden unirse a biomoléculas no específicas o bien provocar daños oxidativos debido a su habilidad para catalizar reacciones de oxidación-reducción. Esto puede terminar en la desactivación de las reacciones enzimáticas esenciales, dañar las estructuras celulares y modificar el ADN. En humanos, exposiciones cortas a altos niveles de metales pueden causar síntomas de toxicidad aguda, mientras que exposiciones largas de ciertos metales a niveles bajos puede provocar toxicidad crónica, siendo posible el desarrollo de afecciones como el cáncer <sup>15,18,19</sup>.

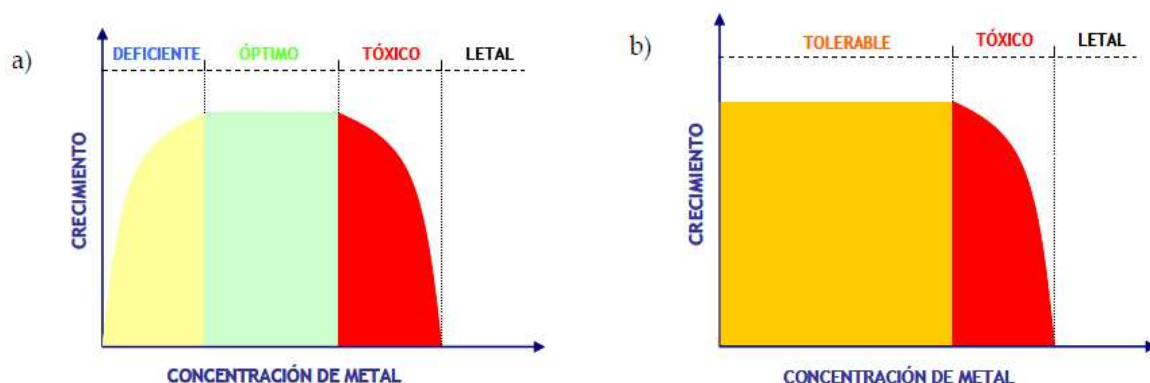


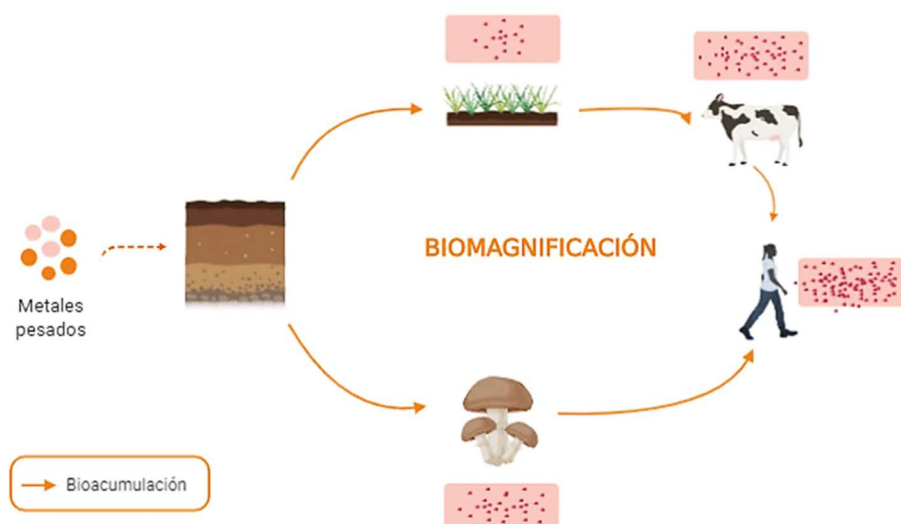
Figura 3. Respuesta de los organismos en función de la concentración de metales (a) esenciales y (b) no esenciales <sup>18</sup>.

Los metales pesados ingresan en el medio a través de actividades naturales (actividad volcánica, meteorización, etc.) y antropogénicas (extracción y procesamiento de minerales, combustión de combustibles fósiles y desechos, etc.) <sup>20</sup>. Estos contaminantes pueden abandonar el medio a través de diversas vías y pasar a los organismos cuando pueden ser bioasimilables, lo que normalmente ocurre cuando se encuentran más o menos solubles. En concreto, la posibilidad de que un elemento (contaminante o no) quede libre y pase a disolución se llama disponibilidad.

La **biodisponibilidad** sería el grado de libertad en que se encuentra un elemento o compuesto de una fuente potencial para ser capturado por un organismo. Normalmente, sólo una fracción pequeña de una sustancia potencialmente contaminante de un medio es biodisponible <sup>21</sup>. La biodisponibilidad de un elemento dependerá de: a) la forma química y física en la que se encuentra en el medio; y b) la capacidad de los organismos para incorporarlos. Estos elementos pueden ser acumulados en el organismo hasta tres, cuatro o cinco órdenes de magnitud mayor que la concentración del medio. Este enriquecimiento, conocido como **bioacumulación**, hace referencia al balance entre la cantidad de metales incorporados a los seres vivos y los que éstos son capaces de eliminar de su propio organismo <sup>18,21</sup>.

El consumo de tejidos contaminados provoca que los metales pesados pasen a la cadena alimenticia. Cuando la bioacumulación ocurre en cada transferencia a niveles tróficos superiores, se produce un incremento de la concentración del contaminante. Este proceso es conocido como **biomagnificación** (Figura 4) <sup>18</sup>.





**Figura 4.** Representación de los procesos de bioacumulación y biomagnificación de metales a lo largo de la cadena trófica. Los cuadros en color naranja representan el incremento de la concentración del contaminante.

Los metales pesados actúan sobre los organismos vivos no sólo en función de su concentración, sino que su acción también viene determinada por otros factores tanto intrínsecos a la naturaleza del propio organismo como a las características del hábitat, además de depender del tiempo de exposición al contaminante y del grado de accesibilidad de éstos por parte de los organismos vivos <sup>18</sup>.

### 3.3. Bioacumulación de metales pesados en setas

Las setas silvestres tienen la capacidad de bioacumular metales pesados en sus tejidos, observándose que la concentración de estos contaminantes en los hongos son considerablemente más altas que las de los cultivos agrícolas: plantas, verduras y frutas, e incluso que en setas cultivadas <sup>22,23</sup>, por lo que, debido al importante papel que están adquiriendo en las dietas, la presencia de altas concentraciones de metales pesados en setas constituye un asunto de gran relevancia en la actualidad <sup>23</sup>. El mecanismo por el cual estos organismos poseen la capacidad de bioacumular metales pesados se explica gracias a la red de hifas situadas en el horizonte superior del suelo <sup>12,24</sup>. Las hifas, constituidas por una fila de células alargadas y tubulares envueltas por una pared de quitina, se encuentran muy extendidas sobre el área biodisponible y, bajo condiciones específicas, acumulan iones metálicos en su citoplasma <sup>25</sup>.

La capacidad de las setas para acumular elementos metálicos puede ser determinada mediante el **factor de bioconcentración** (BCF, *Bioconcentration Factor*), que se define como el cociente entre la concentración del metal existente en la seta y la concentración del metal presente en el suelo donde fructifica <sup>26</sup>. Así pues, factores de bioconcentración mayores que uno ( $BCF > 1$ ) indican que la seta tiende a acumular una concentración superior a la que existe en el suelo en el que crece, siendo en ese caso bioacumuladora para el metal determinado. Por el contrario, factores de bioconcentración menores

que uno ( $BCF < 1$ ) indican que la seta presenta un contenido metálico inferior al del suelo, denominándose en ese caso a la seta como un bioexclutor para ese metal.

### 3.3.1. Factores que afectan a la bioacumulación metálica en setas

La acumulación de metales pesados en setas es un proceso complejo que parece estar afectado tanto por **factores ambientales** (pH, materia orgánica, textura y concentración del metal en el suelo) como por **factores intrínsecos** (taxón, morfología, tamaño, parte del cuerpo fructífero, etapa de desarrollo y edad del micelio), que influyen en la biodisponibilidad de estos contaminantes en el medio <sup>22,27</sup>.

Los estudios que han examinado el contenido de metales pesados tanto en muestras de setas como en los suelos donde éstas fructificaron parecen indicar que la bioacumulación varía considerablemente dependiendo del elemento y de la especie <sup>28-30</sup>. Sin embargo, el suelo determina la disponibilidad y movilidad de los metales pesados <sup>27</sup>, por lo que los parámetros como el pH, el porcentaje de materia orgánica y la textura son esenciales a la hora de comprender y explicar la bioacumulación metálica en setas. La mayoría de metales pesados tienden a estar más biodisponibles a pH ácido puesto que son menos fuertemente adsorbidos, excepto As, Mo, Se y Cr, que son más móviles a pH alcalino <sup>21</sup>. Por otro lado, los suelos arcillosos retienen más metales por adsorción o mediante intercambio catiónico con los minerales de las arcillas, mientras que, los arenosos, carecen de capacidad de fijación pudiéndose contaminar el nivel freático <sup>21</sup>. Otro parámetro importante es el porcentaje de materia orgánica, puesto que ésta reacciona con los metales formando compuestos organometálicos que facilitan la solubilidad del metal, la disponibilidad y la dispersión <sup>21</sup>.

Centrándonos en los factores intrínsecos, algunos autores reportan que se han observado concentraciones metálicas mayores en setas más jóvenes. Esto se debería al transporte del metal desde el micelio hasta el cuerpo fructífero al comenzar la fructificación del hongo. A medida que la seta comienza a desarrollarse y aumenta la masa corporal fructífera, la concentración del metal pesado disminuye <sup>31,32</sup>. No obstante, la etapa de desarrollo y el tamaño de la seta parecen ser factores que afectan en menor medida a la bioacumulación metálica en comparación con la edad del micelio. Los estudios realizados por ejemplo con muestras de *Agaricus bisporus* silvestres y cultivadas, han revelado que las concentraciones de metales pesados son más elevadas en las silvestres <sup>31</sup>. Esto puede explicarse no sólo por las diferencias en la composición del sustrato y la contaminación, sino también por la edad del micelio, que puede ser de varios años en la naturaleza en comparación con los micelios de pocos meses que encontramos en las plantas de cultivo <sup>31</sup>.

## 3.4. Antecedentes bibliográficos

### 3.4.1. Áreas geográficas estudiadas

En las últimas décadas la bioacumulación de metales pesados en setas ha ido adquiriendo una mayor relevancia científica desde que éstas se han convertido en objeto de interés para los consumidores.



De esta forma, se han publicado varios artículos que recogen estudios acerca de la acumulación de metales pesados en setas principalmente en las regiones de China, Turquía y Polonia<sup>15,17,40,23,33-39</sup>, donde la mayoría de ellos se refieren a los elementos determinados desde un punto de vista nutricional y, preferiblemente, como un riesgo potencial para la salud humana<sup>17,32</sup>.

Aunque España ha sido considerada como un territorio esencialmente micófono, hoy en día, los recientes cambios en la demanda propiciados por el interés en las propiedades nutricionales de las setas y el apoyo de las administraciones públicas al medio rural han convertido a este alimento en un recurso con posibilidad de repercutir en el desarrollo de los espacios rurales bajo una doble perspectiva: comercial y recreativa. Así pues, dentro de este contexto, el micoturismo o turismo micológico presenta una demanda cada vez más creciente<sup>41,42</sup>. En base a esto, el consumo de setas silvestres en España ha crecido como resultado de la atracción de un mayor número de personas por las beneficiosas propiedades que aportan al organismo, siendo el consumo medio de setas silvestres y cultivadas a nivel nacional según la Agencia Española de Salud Alimentaria y Nutrición (AESAN) de 5,61 g/persona/día<sup>16,43</sup>. De todas las setas que se consumen en España, el champiñón (*Agaricus bisporus*) ocupa un lugar destacado con un 70% aproximado del consumo total, seguido por las pleurotus o setas de concha (*Pleurotus ostreatus*) y otras setas de temporada o silvestres, como los níscalos (*Lactarius deliciosus*), las setas de pie azul o lepidistas (*Lepista nuda*), los boletos (*Boletus edulis*) y las colmenillas (*Morchella esculenta*)<sup>7</sup>.

Como se sabe, España posee una gran variedad de hongos, y en particular la región Andaluza, ya que debido a su clima benigno y su enorme variedad de formaciones vegetales hacen de ella un verdadero paraíso para los amantes de la micología. En Andalucía existen alrededor de 1000 taxones diferentes y un 41% de la diversidad fúngica se encuentra en la provincia de Cádiz. Sin embargo, a pesar de la riqueza fúngica que posee este país, se han llevado a cabo escasos estudios acerca de la bioacumulación metálica en setas, siendo especialmente las zonas más exploradas las de la región norte del país, como indican los estudios de Alonso y col.<sup>44</sup> y Melgar y col.<sup>45</sup>, los cuales han investigado principalmente muestras procedentes de Lugo. Así pues, en vista de la escasez de estudios acerca de la bioacumulación metálica en setas de interés gastronómico a nivel nacional, y especialmente en Andalucía, este Trabajo Fin de Máster se centrará en el estudio de muestras recolectadas en distintas localizaciones de la provincia de Cádiz. Además, dada la estrecha relación existente entre el grupo de investigación AGR-122 con la Universidad de Abdelmalek Essadi, también se estudiarán muestras en la región norte de Marruecos, la cual está inexplorada a nivel de este campo de investigación, ya que los estudios actuales sobre la bioacumulación metálica en setas en el continente africano se han centrado en Nigeria<sup>26</sup>.

### 3.4.2. Especies de setas estudiadas

Los estudios efectuados por Melgar y col.<sup>16</sup>, Ostos y col.<sup>43</sup>, Alonso y col.<sup>44</sup> y Campos y col.<sup>46,47</sup> señalan que a nivel de España este campo de investigación se ha centrado especialmente en el estudio

de la bioacumulación de metales pesados en la especie *Macrolepiota procera*, *Lactarius deliciosus*, *Boletus aereus* y *Amanita caesarea*, las cuales constituyen setas de alto interés gastronómico no solo a nivel nacional, sino también a nivel internacional <sup>15,48,49</sup>.

En función de las diferentes especies estudiadas en investigaciones anteriores, para este Trabajo Fin de Máster se ha seleccionado la especie *Lactarius deliciosus* por ser una de las setas más buscadas y consumidas a nivel nacional, y además, ser muy abundante en la provincia de Cádiz <sup>9</sup>. Esta seta, conocida comúnmente como níscolo o rebollón, constituye el cuerpo fructífero de una especie de hongo basidiomiceto perteneciente a la familia *Russulaceae* <sup>50</sup> que suele aparecer en pinares y bosques mixtos entre otoño e invierno formando micorrizas con diversas coníferas, especialmente del género *Pinus* <sup>9</sup>, siendo muy frecuente en los pinares de la provincia de Cádiz <sup>9</sup>. Por lo general, fructifica a cualquier altitud y en suelos neutros o calcáreos, aunque puede establecerse en suelos ácidos y básicos <sup>50</sup>. El níscolo (Figura 5) posee un diámetro de sombrero de 5-20 cm <sup>9</sup>, siendo convexo o plano en su juventud pero que con la madurez tiende a formar una depresión en el centro que le atribuye forma de copa <sup>50</sup>. Se caracteriza por presentar un color anaranjado con máculas verdosas en ejemplares viejos en sus distintas partes (sombrero, himenio y pie) y por desprender un látex exiguo o anaranjado al corte <sup>9</sup>. El pie de esta especie es cilíndrico, hueco y quebradizo, y no presenta anillo <sup>9</sup>.



Figura 5. Imagen de *Lactarius deliciosus* cedida por la Asociación Micológica Mairei.

Atendiendo a las investigaciones realizadas por Alonso y col. <sup>44</sup> y Campos y col. <sup>47</sup>, y con el fin de estudiar la bioacumulación de metales de diferente toxicidad, se han establecido como analitos para este estudio dos metales esenciales, cobre y zinc, y dos metales no esenciales, plomo y cromo. En el *Apéndice I* de la presente Memoria se puede encontrar información detallada acerca de los perfiles toxicológicos de estos cuatro metales.



## 4. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Máster tiene como objetivo principal estudiar la bioacumulación metálica en una especie de seta de alto interés gastronómico como es el níscolo, *Lactarius deliciosus*. Para ello, se determinará el contenido total tanto en metales esenciales (cobre y zinc) como en metales tóxicos (cromo y plomo) en muestras recolectadas en diversas localizaciones geográficas del sur de España y norte de Marruecos, clasificadas en: zonas limpias como la Reserva Natural de Bouhachem en el norte de Marruecos, el Sendero del Palancar en el Parque Natural de los Alcornocales y Jimena de la Frontera en la Sierra de Cádiz; zonas intermedias o semi-antrópicas, como el Pinar de la Dehesa de las Yeguas en Puerto Real, el Pinar del Colorado en Conil de la Frontera y el Pinar del Rey en San Roque, que se encuentra próximo al Campo de Gibraltar; y, finalmente, una zona no limpia próxima a la carretera en las inmediaciones a Chefchaouen, ciudad del norte de Marruecos.

Para la consecución del objetivo principal se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Llevar a cabo la recolección y toma de muestra de los níscolos y suelos de fructificación en las distintas localizaciones geográficas.
- Optimizar la técnica de digestión ácida para muestras de setas mediante empleo de bloque digestor.
- Determinar el contenido total de Cu, Zn, Cr y Pb en muestras de níscolos y suelos por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).
- Comparar el contenido total de metales analizados en las muestras de suelos con los límites máximos permitidos, para poder establecer si las zonas geográficas muestreadas están o no contaminadas por Cu, Zn, Cr o Pb.
- Clasificar las muestras de *Lactarius deliciosus* en bioacumuladoras o bioexcluidoras para cada metal mediante el cálculo del factor de bioconcentración (BCF, *Bioconcentration Factor*).
- Valorar mediante técnicas quimiométricas y estudios estadísticos qué factores afectan a la presencia de metales pesados en los suelos de fructificación y a la bioacumulación de metales en la especie *Lactarius deliciosus*.
- Establecer la ingesta diaria estimada de metales (EDIM, *Estimated Daily Intake of Metals*) para cada una de las muestras de *Lactarius deliciosus* y comparar los resultados obtenidos con los valores de consumo diario permitidos.

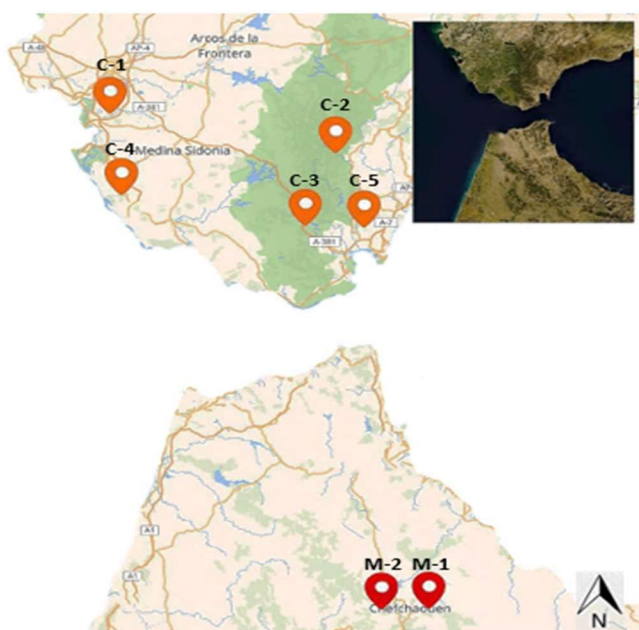
## 5. MATERIALES Y MÉTODO

### 5.1. Materiales

#### 5.1.1. Material biológico empleado y localizaciones geográficas

Para el presente Trabajo Fin de Máster se han estudiado un total de siete muestras de *Lactarius deliciosus* que fueron recolectadas a finales de otoño y principios de invierno en distintas localizaciones del sur de España y norte de Marruecos, muestreándose un total de siete localizaciones. Como se muestra en la Figura 6, el área estudiada en el sur de España engloba cinco puntos de interés de la provincia de Cádiz por ser zonas con una amplia vegetación y tipos de hábitats, mientras que el área estudiada en el norte de Marruecos está conformada por dos ubicaciones de interés situadas en las montañas del Rif y próximas a la ciudad de Chefchaouen. Las zonas han sido clasificadas en tres categorías en función de su proximidad a núcleos urbanos o industriales, quedando de la siguiente manera:

- **Zonas no limpias:** Constituida por la carretera de las inmediaciones a la ciudad de Chefchaouen (M-1), situada al norte de Marruecos.
- **Zonas limpias:** Constituidas por la Reserva Natural de Bouhachem (M-2), situada en el norte de Marruecos, Jimena de la Frontera en la Sierra de Cádiz (C-2) y el Sendero del Palancar en el Parque Natural de los Alcornocales (C-3).
- **Zonas semi-antrópicas:** Conformadas por el Pinar de la Dehesa de las Yeguas en Puerto Real (C-1), el Pinar del Colorado en Conil de la Frontera (C-4) y el Pinar del Rey (C-5), próximo al Campo de Gibraltar.



**Figura 6.** Mapa de las localizaciones muestreadas del sur de España y norte de Marruecos. C-1: Dehesa de las Yeguas; C-2: Jimena de la Frontera; C-3: El Palancar; C-4: El Colorado; C-5: Pinar del Rey; M-1: Chefchaouen; M-2: Bouhachem.

Además de las muestras de *Lactarius deliciosus* se recogieron los suelos de fructificación con vistas a establecer los factores de bioconcentración (BCF), así como para medir parámetros fisicoquímicos del suelo. En la Tabla A1 del *Apéndice II* se expone un listado con información detallada de las muestras de *Lactarius deliciosus* y los suelos de fructificación.

### 5.1.2. Reactivos

Para el análisis a nivel de microtrazas y ultramicrotrazas es necesario emplear reactivos de alta calidad tomando en todo momento las precauciones necesarias para evitar su contaminación durante la manipulación y conservación. Todos ellos aparecen reflejados en la Tabla 1. El agua que se utilizó para la preparación de las disoluciones era de calidad Milli-Q (18 mΩ/cm) y fue obtenida a través de un sistema de purificación de agua Millipore (Burlington, Massachusetts, Estados Unidos).

**Tabla 1.** Reactivos comerciales empleados.

Reactivo	Fórmula	Pureza	Casa Comercial
Ácido clorhídrico PlasmaPURE	HCl	34 – 37%	SCP Science
Ácido nítrico PlasmaPURE	HNO <sub>3</sub>	67 – 69%	SCP Science
Peróxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	≥ 30%	Sigma-Aldrich®
Ácido fluorhídrico	HF	47-51%	Fluka™

### 5.1.3. Material de referencia certificado (MRC)

La validación del método se garantizó haciendo uso de materiales de referencia certificados (MRC) para setas y suelos. Los MRC son muestras altamente homogéneas y estables para una propiedad específica empleados para comprobar la calidad y trazabilidad del análisis <sup>51</sup>. Su uso en este trabajo es de gran importancia puesto que permiten asegurar la calidad de los resultados del contenido metálico en las muestras de setas y suelos mediante ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente), que es la técnica de análisis empleada en este trabajo.

Para el análisis de setas mediante ICP-MS se empleó como MRC el “Control Material CS-M-3” (*Boletus Edulis* pulverizado), distribuido por LGC Standars (Middlesex, Reino Unido) y producida por el Instituto de Química Nuclear y Tecnología de Varsovia (Polonia). Este material de referencia presenta valores certificados para ocho elementos: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Se y Zn. En el caso de los suelos, se empleó como “MRC EnviroMAT Contaminated Soil” (SS-2) de SCP Science (Montreal, Quebec, Canadá). Dicho material de referencia presenta valores certificados para 31 elementos: Ag, Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sb, Se, Sn, Sr, Tl, U, V y Zn.

#### 5.1.4. Patrones de calibración para ICP-MS

Para la preparación del patrón multielemental a partir del cual se establecieron los patrones para construir las rectas de calibrado se emplearon patrones de calibración mono elementales de Cu, Zn, Pb y Cr de concentraciones iguales a 1000 µg/mL de SCP Science (Montreal, Quebec, Canadá).

### 5.2. Instrumentación y equipos

#### 5.2.1. Bloque digestor

El método de digestión ácida en bloque digestor se llevó a cabo empleando el equipo DigiPrep Jr (Figura 7) (SCP Science; Montreal, Quebec, Canadá) perteneciente a la División de Espectroscopía Atómica de los Servicios Centrales de Investigación Científica y Tecnológica (SC-ICyT) de la Universidad de Cádiz. Se trata de un bloque de digestión recubierto de teflón que cuenta con 24 posiciones para DigiTubes de 50 mL con aplicaciones de hasta 180 °C y que tiene incluida una pantalla de control que permite establecer las rampas de temperaturas y tiempos de digestión de las muestras.

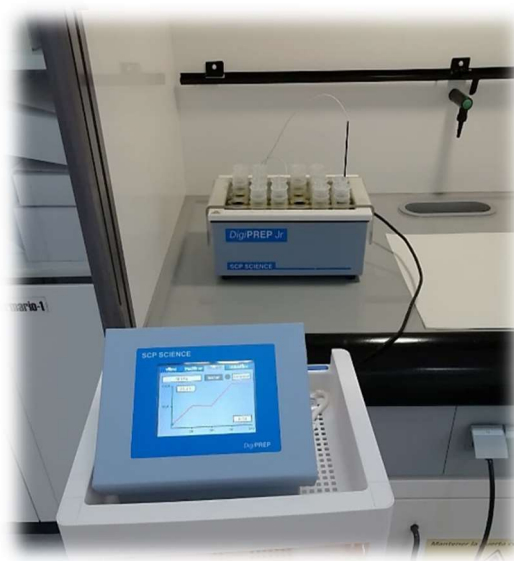


Figura 7. Bloque digestor DigiPrep Jr de SCP Science.

#### 5.2.2. Espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

El espectrómetro de masas con plasma de acoplamiento inductivo (Figura 8) empleado para la cuantificación de metales es un Modelo Serie XII de Thermo Elemental (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) que pertenece a la División de Espectroscopía Atómica de los Servicios Centrales de Investigación Científica y Tecnológica (SC-ICyT) de la Universidad de Cádiz. Durante el desarrollo experimental de esta investigación, el ICP-MS estaba equipado con una celda de colisión/reacción de tipo hexapolo, cámara de nebulización ciclónica de PFA y antorcha con inyector de zafiro.

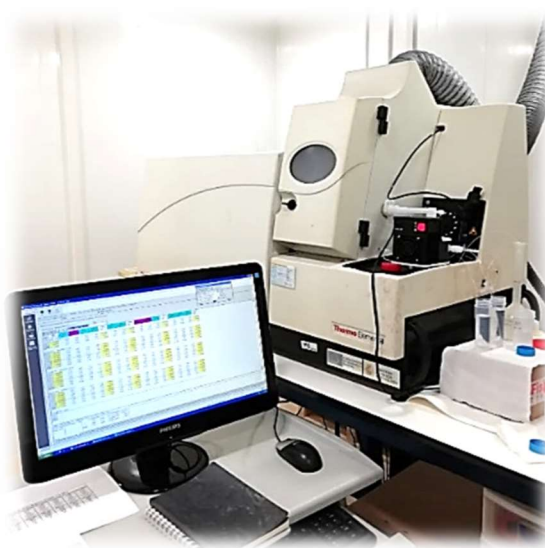


Figura 8. Equipo ICP-MS Modelo Serie XII de Thermo Elemental.



### 5.3. Softwares

Los softwares y programas informáticos empleados para el desarrollo del presente Trabajo de Fin de Máster han sido: PlasmaLab™, software del equipo de ICP-MS Serie XII de Thermo Elemental; STATGRAPHICS Centurion XVI (The Plains, Virginia, Estados Unidos) y OriginPro 2017 (Northampton, Massachusetts, Estados Unidos) para el estudio estadístico y aplicación de técnicas quimiométricas; Lenguaje de programación Python 3 y librería de Python Matplotlib para generar gráficos; BioRender (Toronto, Ontario, Canadá) para la elaboración de figuras científicas y Mendeley (Londres, Reino Unido) para gestionar las referencias bibliográficas de la presente memoria.

### 5.4. Procedimiento experimental

El trabajo de investigación se ha llevado a cabo siguiendo las etapas del proceso analítico: (1) Elección de la técnica de análisis, (2) Toma de muestras, (3) Preparación y tratamiento de las muestras, (4) Digestión ácida de la muestra, (6) Análisis y cuantificación y (7) Discusión e interpretación de los resultados.

#### 5.4.1. Elección de la técnica de análisis

La elección de la técnica instrumental constituye la primera etapa del proceso analítico una vez definido el problema, que en el caso concreto de esta investigación es el estudio de la bioacumulación metálica en la seta de interés gastronómico *Lactarius deliciosus*. Puesto que el estudio se centrará en la determinación simultánea del contenido total de Zn, Cu, Pb y Cr a nivel de microtrazas, el método de análisis seleccionado es la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) por ser una técnica de determinación multielemental que permite trabajar en los rangos de concentraciones en los que se encuentran los distintos metales en las muestras (concentraciones de ng/mL).

##### 5.4.1.1. Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

Desde principios de los años ochenta la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo se ha perfeccionado hasta convertirse en una de las técnicas más importantes para el análisis elemental, abarcando campos de aplicación ambiental, alimentaria, biomédica, nuclear, etc.<sup>52</sup>.

El ICP-MS es el resultado de la combinación de una fuente de ionización elemental de alta eficacia (ICP) y la espectrometría de masas (MS). Aunque esta técnica puede determinar ampliamente el mismo conjunto de elementos que otras técnicas espectroscópicas atómicas, como la espectroscopía de absorción atómica con llama (EAA) y la espectroscopía de emisión con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES), el ICP-MS tiene claras ventajas en cuanto a velocidad de análisis, sus bajos límites de detección, su alto grado de selectividad y su buena precisión y exactitud<sup>53</sup>.

A pesar de que existen distintos diseños de ICP-MS disponibles, todos ellos comparten los componentes principales que son: el sistema de introducción de la muestra, el plasma como fuente generadora de iones, la interfase de muestreo, el sistema de focalización de iones, el sistema analizador de masas y el sistema de detección <sup>52,53</sup>. En la Figura 9 se muestra un esquema de los componentes básicos de un equipo de ICP-MS.

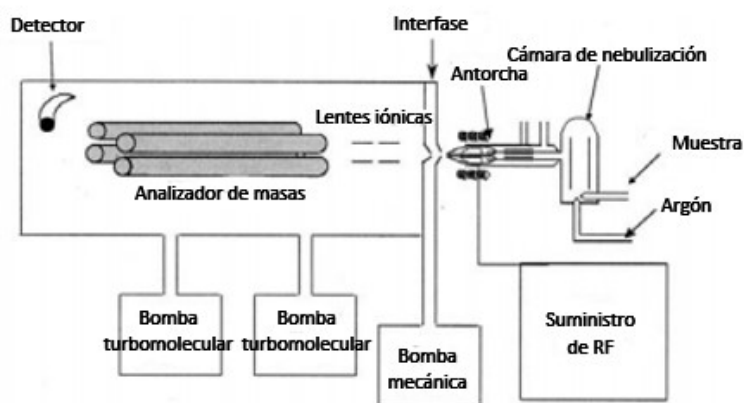


Figura 9. Esquema de los componentes básicos de un ICP-MS <sup>53</sup>.

La muestra, que normalmente se encuentra disuelta, es introducida con ayuda de una bomba peristáltica en el sistema de nebulización, donde se transforma con ayuda del gas de nebulización (Ar) en un fino aerosol <sup>52</sup>. El aerosol es transportado hacia la cámara de nebulización donde las gotas son aceleradas, permitiendo que se separen según el tamaño. Las gotas de menor tamaño emergen a través del tubo de salida de la cámara de nebulización y entran mediante un inyector de muestra en la antorcha del plasma <sup>53</sup>. El plasma se forma cuando un flujo tangencial de gas inerte de Ar que circula a través de un tubo concéntrico (antorcha) es sometido a la acción de un campo magnético oscilante producido por una bobina de inducción, alimentada por un generador de radiofrecuencias. Esto tiene el efecto de ionizar el gas que, cuando es sometido a una chispa de alto voltaje, da lugar a una descarga de plasma de elevadas temperaturas (10.000 K) en el extremo del tubo <sup>53</sup>. En contraposición con la técnica de ICP-AES donde el plasma se emplea para generar fotones de luz, en ICP-MS el plasma se utiliza para producir iones cargados positivamente y no fotones. De hecho, se hace todo lo posible para evitar que los fotones alcancen el detector, ya que tiene el potencial de aumentar el ruido de la señal. Es precisamente la producción y detección de grandes cantidades de estos iones lo que confiere al ICP-MS su característica de detección a niveles de microtrazas y ultramicrotrazas <sup>53</sup>.

Una vez los iones son generados en el plasma, éstos se dirigen hacia el espectrómetro de masas a través de la región de la interfase. La interfase une la antorcha de plasma acoplado por inducción, la cual funciona a presión atmosférica, con el espectrómetro de masas que requiere una presión inferior a  $10^{-4}$  torr <sup>52</sup>. Esta unión se efectúa mediante un acoplador de interfase de vacío diferencial que consta de un cono de muestreo de níquel (*sampler*) que presenta un pequeño orificio en el centro de  $< 1,0$  mm. El plasma caliente pasa por este orificio a una región que se mantiene a una presión de alrededor de 1 torr



por medio de una bomba mecánica <sup>52</sup>. En esta región se produce una expansión rápida del gas, cuyo resultado es el enfriamiento del plasma. Una fracción del gas presente en esta zona pasa a través de un pequeño agujero hacia un segundo cono denominado separador (*skimmer*) <sup>52</sup> y hacia una cámara que se mantiene a la presión del espectrómetro de masas. Aquí los iones positivos se separan de los electrones y de las especies moleculares de potencial negativo mediante una lente magnética de iones hasta el orificio de entrada del analizador de masas <sup>53</sup>. Previamente a entrar en el analizador de masas, los iones que contienen los analitos y los iones de la matriz pasan a la celda de reacción/colisión, que consiste en un multipolo (cuadrupolo, hexapolo u octapolo) que trabaja en el rango de las radiofrecuencias y cuyo cometido es eliminar las interferencias espectrales ocasionadas por el Ar y reducir el efecto de matriz. Para ello, el gas de reacción (por ejemplo, mezcla de H<sub>2</sub>/He) es inyectado en la celda, cuyo campo de radiofrecuencia enfoca el haz de iones para que colisionen y reaccionen con el gas <sup>53</sup>. Finalmente, los iones pasan al analizador de masas, normalmente un cuadrupolo, que permite que únicamente pase al detector (multiplicador electrónico) la relación *m/z* escogida.

#### 5.4.2. Toma de muestras

El muestreo de *Lactarius deliciosus* se llevó a cabo recolectando varios ejemplares de la especie en cada una de las zonas para así disponer de una muestra representativa. De cada ejemplar se anotaron sus coordenadas GPS y localización geográfica exacta. Los ejemplares fueron recolectados con ayuda de un cuchillo de plástico y se almacenaron en bolsas de plástico perfectamente etiquetadas. Finalmente, se reunieron todos los individuos de una misma zona para conformar una única muestra. Además de cada uno de los ejemplares de setas, se recogió una cierta porción del suelo sobre el que éstas crecieron (0-10 cm). Para ello, se retiró la capa superior vegetal del suelo colindante donde fructificó la seta recolectada y se cogió un volumen constante de suelo con un vaso de plástico. Las porciones de suelo muestreadas en cada punto fueron mezcladas y almacenadas en bolsas de plástico etiquetadas hasta su llegada al laboratorio.

#### 5.4.3. Preparación y tratamiento de las muestras

En esta etapa se sometió a las muestras de *Lactarius deliciosus* y correspondientes suelos a un tratamiento previo para reducir el tamaño de sus partículas y lograr homogeneidad. Así mismo, se eliminó la humedad de éstas para que no interfiriera en los resultados.

Por un lado, las muestras de *Lactarius deliciosus*, previamente lavadas con agua Milli-Q, fueron sometidas a un secado a 50 °C durante 48 h en estufa. A continuación, se pulverizaron en mortero de Ágata con el fin de aumentar la superficie de contacto entre la muestra y el disolvente de cara a la etapa de digestión ácida, y así obtener mejores recuperaciones de los metales presentes. El pulverizado obtenido se almacenó finalmente en tubos Falcon hasta su digestión. Posteriormente, para la digestión ácida de las muestras, se llevó a cabo la pesada de 250 mg de cada muestra preparada de *Lactarius deliciosus* en DigiTubes de 50 mL empleando una balanza AS 82/220.2 de Radwag (North Miami

Beach, Florida, Estados Unidos) y un ionizador antiestático DJ 04 de Radwag (North Miami Beach, Florida, Estados Unidos).

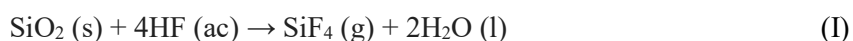
Por su parte, las muestras de suelos fueron secadas primero a temperatura ambiente hasta peso constante. Tras ello, se homogeneizaron con mortero de Ágata y se tamizaron con un tamiz de malla de nylon de 63 µm de tamaño de poro (Filtrá Vibración, S.L.; Barcelona, España) para obtener la fracción fina ( $\leq 63 \mu\text{m}$ ), que constituye la parte del suelo donde tiende a acumularse un mayor contenido metálico. Finalmente, las muestras de suelos tamizadas fueron secadas a 50 °C en estufa durante 48 h. Las muestras se almacenaron en botes de plástico hasta su análisis. Previamente a la digestión ácida, se pesaron 50 mg de cada muestra de suelo en DigiTubes de 50 mL empleando una balanza AS 82/220.2 de Radwag (North Miami Beach, Florida, Estados Unidos) y un ionizador antiestático DJ 04 de Radwag (North Miami Beach, Florida, Estados Unidos).

#### 5.4.4. Digestión ácida de la muestra

La determinación del contenido total de metales en muestras reales implica, en la mayoría de los casos, llevar a cabo un primer paso de disolución para transformar la muestra sólida en fase líquida. La disolución de las muestras tiene lugar empleando reactivos que no interfieran en el proceso global del análisis y que permitan disolverlas de forma cuantitativa y rápida. La elección de los ácidos a emplear viene dada en función de la naturaleza de la muestra y de los analitos objeto de estudio. En el caso concreto de esta investigación, se trabajó con un total de cuatro analitos metálicos (Cu, Zn, Pb y Cr) y con dos tipos de matrices: una matriz orgánica en el caso de las muestras de *Lactarius deliciosus* y una matriz inorgánica en las muestras de suelo. Debido a esto, la selección de la mezcla de ácidos a emplear es crucial para obtener unas buenas recuperaciones en las medidas por ICP-MS.

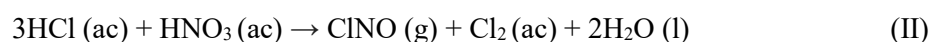
Las muestras con matrices orgánicas son generalmente digeridas usando ácidos con un alto poder oxidante, como son el ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y el ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ). No obstante, el ácido nítrico es el reactivo empleado por excelencia en digestión de muestras de setas en conjunto con otros agentes oxidantes como es el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )<sup>34,54</sup>.

Cuando se tienen muestras que presentan una matriz inorgánica como es el caso de los suelos, normalmente se suele emplear el ácido fluorhídrico (HF), ya que es uno de los pocos ácidos que pueden disolver silicatos gracias a la capacidad complejante del ion fluoruro según la reacción general (I), mostrada a continuación<sup>55,56</sup>:



La digestión con ácido fluorhídrico produce principalmente fluoruros solubles, a excepción de los fluoruros de las tierras alcalinas, lantánidos y actínidos, los cuales son insolubles o escasamente solubles en presencia del ácido fluorhídrico<sup>55,56</sup>. Para mejorar la descomposición de los compuestos inorgánicos, el HF se mezcla rutinariamente con otros ácidos, como por ejemplo el ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ )<sup>56</sup>. Sin

embargo, tanto en el caso de matrices silíceas como de matrices orgánicas, es necesario tener en cuenta la naturaleza de los analitos. De los cuatro analitos estudiados, el cromo (Cr) constituye un elemento altamente problemático debido a su naturaleza, puesto que suele presentarse en forma de un óxido refractario conocido como cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ) que resiste la acción del ácido nítrico, dando lugar a menores porcentajes de recuperación de este elemento. Para lograr la mayor extracción del contenido de cromo posible se emplea el ácido clorhídrico (HCl) en las digestiones <sup>57</sup>, ya que posibilita su complejación y estabilización debido a la presencia del ion cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) como consecuencia de la reacción general (II) <sup>58</sup>:



Otro aspecto importante es el método de digestión seleccionado para llevar a cabo la descomposición y disolución de la muestra. En base a la documentación bibliográfica acerca de la bioacumulación de metales en setas, se ha observado que generalmente se emplea la digestión ácida asistida por microondas <sup>34,59,60</sup>. Este método implica el uso de la radiación de microondas para llevar a cabo la descomposición de la materia orgánica en reactores cerrados. No obstante, en este trabajo se va a proponer como método alternativo para la extracción de metales la digestión con bloque digestor, ya que presenta ciertas ventajas frente a la forma convencional.

El empleo del bloque digestor permite llevar a cabo la digestión de un gran número de muestras simultáneamente, puesto que en el mercado encontramos bloques digestores que presentan hasta 48 posiciones para la preparación de muestras. Este hecho supone una ventaja frente al método convencional de digestión asistida por microondas donde los equipos normalmente presentan 10 posiciones. Otra de las ventajas reside en el hecho de que el bloque digestor supone ser un método más seguro para el analista al no requerir del uso de altas presiones y temperaturas, como las que se alcanzan en el sistema de digestión con microondas. Desde el punto de vista económico, los bloques digestores resultan ser más rentables debido a su menor coste. Este hecho implica que cualquier laboratorio pueda adquirir el equipo y, también, un abaratamiento de los gastos globales de la investigación. Finalmente, el uso de bloque digestor supone una mayor simplicidad en el proceso de operación pues, en este caso, solamente será necesario introducir en el bloque digestor el tubo digestor con la muestra y volúmenes de ácidos apropiados. De esta forma, no se requiere un gran número de accesorios ni complejidad de montaje, como en el caso del sistema de digestión con microondas.

Dado que en la bibliografía no se han desarrollado estudios previos donde se lleve a cabo la digestión de muestras de setas con bloque digestor, se realizó una optimización previa. Por otro lado, en los Servicios Centrales de Investigación Científica y Tecnológica (SC-ICyT) de la Universidad de Cádiz se encuentra establecido un método interno para la digestión de sedimentos que fue el empleado para las muestras de suelos.

#### 5.4.4.1. Optimización del método de digestión para muestras de setas

La optimización del método de digestión ácida para muestras de setas mediante bloque digestor se llevó a cabo por medio de un diseño univariante de volúmenes de ácidos que permitía seleccionar la mezcla con la que se obtienen unas mayores recuperaciones de Cu, Zn, Cr y Pb. Para efectuar las experiencias del diseño univariante fue necesario establecer unas condiciones de compromiso en cuanto a temperaturas empleadas, tiempos y método de digestión, por lo que se realizó una revisión bibliográfica previa centrada en la búsqueda de investigaciones que emplearan este método para digerir matrices similares a la de las setas <sup>61-65</sup>.

En la Tabla 2 se muestran los analitos, el tipo de muestra, así como las condiciones y metodología de cada uno de los artículos revisados.

**Tabla 2.** Revisión bibliográfica sobre el empleo de bloque digestor en matrices orgánicas de origen vegetal.

Referencia	Muestra	Analitos	Método de digestión
Assad et al. 2016 <sup>61</sup>	Hojas de alamo	Hg	N.º de digestiones: 1   Mezcla de ácidos: 2 mL HNO <sub>3</sub> / 5 mL HCl   Temperatura: 100 °C   Tiempo: 265 min.
Calzoni et al. 2007 <sup>62</sup>	Rosa rugosa	Pb, Cr, Cd, Ni	N.º de digestiones: 1   Mezcla de ácidos: 3 mL HNO <sub>3</sub> / 1 mL HCl / 3 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   Temperatura: 90 °C
Engbersen et al. 2019 <sup>63</sup>	Cacao	Cd	N.º de digestiones: 1   Mezcla de ácidos: 2 mL HNO <sub>3</sub> / 6 mL HCl   Temperatura: 120 °C   Tiempo: 90 min.
Grüter et al. 2019 <sup>64</sup>	Trigo	Cd, Zn	N.º de digestiones: 2   Mezcla de ácidos: (1) 15 mL HNO <sub>3</sub> / (2) 3 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   Temperatura: (1,2) 120 °C   Tiempos: (1,2) 90 min.
Pierart et al. 2018 <sup>65</sup>	Micorriza	Sb	N.º de digestiones: 3   Mezcla de ácidos: (1) 5 mL HNO <sub>3</sub> / (2) 5 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   Temperaturas: (1) 80 °C / (2) 55 °C / (3) 80 °C   Tiempos: (1) 90 min / (2) 25 min / (3) 180 min.

Las condiciones de compromiso seleccionadas para llevar a cabo el diseño univariante de volúmenes de ácidos implican una primera digestión con HCl/HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O a 65 °C durante 30 minutos y una segunda digestión con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 110 °C durante 60 minutos. Cada una de las dos digestiones tiene lugar aplicando dos rampas de tiempo para que el calentamiento de la muestra sea de forma progresiva y se minimicen las pérdidas por volatilización. Así, la primera rampa implica 20 minutos hasta llegar a 65 °C y, una vez alcanzados, 30 minutos a temperatura estable. La segunda rampa de tiempo tiene lugar

durante 30 minutos hasta alcanzar los 110 °C, y tras ello se mantiene 60 minutos a temperatura estable. El diseño univariante de volúmenes de ácidos englobó tres experiencias llevadas a cabo con el material de referencia certificado Control Material CS-M-3.

Los digeridos correspondientes a cada experiencia fueron analizados por ICP-MS para obtener el porcentaje de recuperación de cada uno de los cuatro analitos en estudio. En la Tabla 3 se muestran las mezclas de ácidos de cada experiencia, así como las recuperaciones obtenidas para cada uno de los metales.

**Tabla 3.** Experiencias del diseño univariante de volúmenes de ácidos y recuperaciones (%) obtenidas para cada metal.

Experiencia	Volúmenes (mL)	Recuperaciones (%)			
		Cu	Zn	Cr	Pb
1	2:2:5:3 H <sub>2</sub> O/HCl/HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	103	100	73	141
2	2:1:4:2 H <sub>2</sub> O/HCl/HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	101	105	48	134
3	2:1:3:1 H <sub>2</sub> O/HCl/HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	99	105	54	139

En función de las recuperaciones obtenidas, se seleccionó la mezcla de ácidos 2:2:5:3 H<sub>2</sub>O / HCl / HNO<sub>3</sub> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para llevar a cabo la digestión ácida de las muestras de *Lactarius deliciosus*, por obtener mediante estas condiciones la mayor recuperación para el caso del Cr (73%), que como se apuntó anteriormente, es el analito más problemático en este estudio. En la Figura 10 se pueden observar dos imágenes tomadas durante la digestión ácida con bloque digestor de las muestras reales de *Lactarius deliciosus*.



**Figura 10.** Imágenes tomadas durante la optimización del método de digestión de setas con bloque digestor.

De esta forma, el método de digestión ácida de setas en bloque digestor quedó optimizado para las condiciones y mezclas de ácidos expuestas en el esquema de la Figura 11. La digestión de cada muestra se llevó a cabo por duplicado y, además, se introdujeron diez blancos de preparación para calcular el límite de detección (LD) y cinco réplicas del material de referencia certificado “Control Material CS-

M-3” para asegurar la calidad de los resultados. Una vez concluida la digestión ácida todos los digeridos se filtraron empleando una toma de vacío de – 600 mbares y el accesorio DigiFILTER, específico para el sistema DigiTUBE de 50 mL, que presenta 1  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Finalmente, fueron llevados a un volumen final de 50 mL con agua Milli-Q.

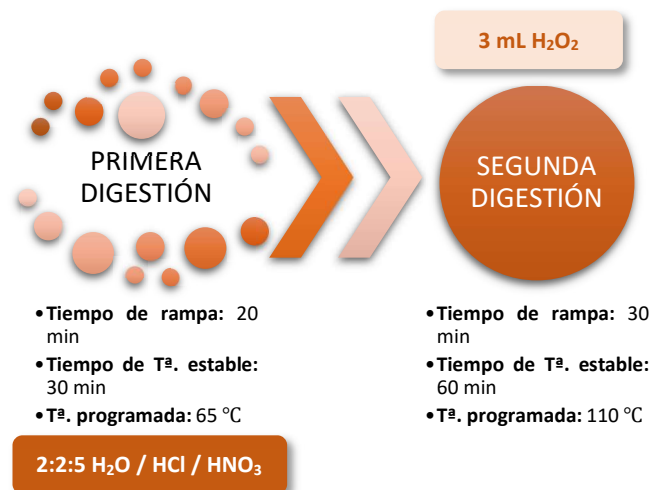


Figura 11. Esquema del método de digestión ácida para setas.

#### 5.4.4.2. Método de digestión para muestras de suelos

La digestión ácida de las muestras de suelos de fructificación con bloque digestor se ha llevado a cabo mediante el método interno desarrollado en la División de Espectroscopía Atómica de los SC-ICyT de la Universidad de Cádiz. Este método implica una primera digestión utilizando una mezcla de ácidos 1:1:1:4 H<sub>2</sub>O/HCl/HF/HNO<sub>3</sub> y una segunda digestión con 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las dos digestiones se llevan a cabo empleando una rampa de tiempo de 45 minutos hasta alcanzar los 110 °C. Una vez alcanzados, se mantiene la digestión de las muestras durante 90 minutos a temperatura estable de 110 °C. Del mismo modo que en la digestión ácida de setas, las muestras de suelos se digieren por duplicado y se introducen diez blancos de preparación. A su vez, se digieren cinco réplicas del material de referencia certificado EnviroMAT Contaminated Soil (SS-2) para asegurar la calidad de los resultados. Una vez concluida la digestión ácida, todos los digeridos de suelos se filtran empleando una toma de vacío de – 600 mbares y el accesorio DigiFILTER, específico para el sistema DigiTUBE de 50 mL, que presenta 1  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Finalmente, son llevados a un volumen final de 50 mL con agua Milli-Q.

### 5.4.5. Análisis

#### 5.4.5.1. Determinación del contenido metálico

La determinación del contenido total de Cu, Zn, Cr y Pb presente en las muestras de *Lactarius deliciosus* y suelos de fructificación se llevó a cabo con el equipo ICP-MS Serie XII de Thermo Elemental (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), aplicando el modo celda de colisión para disminuir las interferencias debidas al Ar y a los efectos de matriz. Las condiciones del equipo se

recogen en la Tabla 4. Además, se empleó un patrón interno preparado por los SC-ICyT de Sc, Ge, Rh, Ir y Bi para corregir variaciones temporales en la intensidad de la señal.

**Tabla 4.** Condiciones de medida y configuración del ICP-MS Serie XII de Thermo Elemental.

	ICP-MS Serie XII Thermo Elemental (Xt, PS, CCT, KED)	
	<i>Lactarius deliciosus</i>	Suelos
Potencia de RF (W)	1400	1400
Flujo del Gas Auxiliar (L/min)	0,84	0,90
Flujo de enfriamiento del Plasma (L/min)	14,00	14,00
Profundidad de muestreo (mm)	60,00	60,00
Flujo del nebulizador (L/min)	0,90	0,74
Hexapolo Bias (V)	-20,00	-20,00
Pole Bias (V)	-17,00	-17,00
CCT (7%H <sub>2</sub> /He) (mL/min)	4,50	4,50

La cuantificación del contenido metálico tanto en los digeridos de setas como en suelos se realizó elaborando una recta de calibrado para cada metal. Así pues, se preparó un patrón multielemental para Cu, Zn, Cr y Pb a distintas concentraciones, establecidas a partir de los valores certificados de las muestras de referencia y en función de los valores observados en un análisis semicuantitativo previo de las muestras con el ICP-MS llevado a cabo por los SC-ICyT. A partir del patrón multielemental se prepararon los restantes patrones de calibración (Tabla 5 y Tabla 6) con los cuales se construyeron las rectas de calibrado para el Cu, Zn, Pb y Cr. Con estos patrones se obtuvieron rectas de calibrado con coeficientes de regresión lineal ( $R^2$ ) mayores de 0,9990.

Cada muestra de *Lactarius deliciosus* y de suelos se analizó por duplicado, implicando cada una de ellas tres medidas por ICP-MS con las que se obtuvieron coeficientes de variación por debajo del 10%. Con el fin de comprobar la exactitud y precisión del equipo se aplicó el material de referencia certificado para setas, “Control Material CS-M-3”, y para suelos, “EnviroMAT Contaminated Soil” (SS-2). Las diferencias entre los valores certificados y las concentraciones cuantificadas fueron menores del 10%.

**Tabla 5.** Concentraciones de los patrones de calibración (µg/L) para la determinación de metales en *Lactarius deliciosus*.

Elemento	P1	P2	P3	P4	P5	P6
<b>Cr</b>	10	20	40	100	200	400
<b>Cu</b>	20	40	100	200	400	800
<b>Pb</b>	0,5	1	2	5	10	20
<b>Zn</b>	50	100	200	500	1000	2000

**Tabla 6.** Concentraciones de los patrones de calibración (µg/L) para determinación de metales en suelos de fructificación.

Elemento	P1	P2	P3	P4	P5	P6
<b>Cr</b>	5	10	20	50	100	200
<b>Cu</b>	5	10	20	50	100	200
<b>Pb</b>	5	10	20	50	100	200
<b>Zn</b>	5	10	20	50	100	200

Adicionalmente, se prepararon diez blancos de preparación tanto de setas como de suelos para establecer el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC). El límite de detección hace referencia a la cantidad mínima de analito que se puede detectar de forma fiable mediante un método analítico concreto y el límite de cuantificación es la cantidad mínima cuantificable. Los LD y los LC obtenidos se exponen en la Tabla 7, y han sido calculados para cada uno de los analitos según las expresiones (III) y (IV). Todas las medidas realizadas estuvieron por encima del límite de detección y de cuantificación.

$$LD = 3 \cdot S_{\text{blanco}} / m \quad (\text{III})$$

$$LC = 10 \cdot S_{\text{blanco}} / m \quad (\text{IV})$$

**m: Pendiente de la recta**

**S: Desviación estándar**





**Tabla 7.** LD y LC (mg/kg) de *Lactarius deliciosus* y suelos referidos a peso de muestra y volumen de disolución para cada uno de los isótopos de los analitos medidos por ICP-MS.

Isotopo	<i>Lactarius deliciosus</i>		Suelos	
	LD	LC	LD	LC
<sup>52</sup> Cr	0,006	0,020	0,300	1,000
<sup>63</sup> Cu	0,200	0,667	0,120	0,400
<sup>208</sup> Pb	0,004	0,013	0,010	0,333
<sup>64</sup> Zn	0,300	1,000	0,780	2,600

#### 5.4.5.2. Medida del pH

Adicionalmente a la determinación del contenido metálico, se analizó el pH de cada muestra de suelo de fructificación. Para ello, se añadieron 25 mL de agua destilada a 10 gramos de suelo previamente aireado y seco. Esta mezcla se mantuvo a 25 °C durante 1 hora <sup>16</sup> y, transcurrido ese tiempo se inició la medida del pH empleando un pH-metro GLP 20. CRISON (Barcelona, España). La medida del pH tuvo lugar por duplicado para cada muestra de suelo.

#### 5.4.5.3. Determinación del porcentaje de materia orgánica

El porcentaje de materia orgánica en el suelo se determinó mediante la pérdida de peso que se produce al calcar la muestra entre 400 y 600 °C utilizando la fracción de tamaño de partícula < 2 mm. De esta forma, el porcentaje de materia orgánica se obtuvo gravimétricamente pesando 2 g de suelo aireado y seco en crisol de porcelana, previamente tarado. Los 2 g de suelo fueron calcinados a 550 °C durante 16 h en horno de mufla <sup>16</sup>. Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar una hora en desecador. Finalmente, el porcentaje de materia orgánica se calculó en base a la expresión (V):

$$\% \text{ de materia orgánica} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \cdot 100 \quad (\text{V})$$

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hasta el momento se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar el contenido metálico en setas comestibles silvestres debido al importante papel que han ido adquiriendo en las dietas. Sin embargo, hasta donde sabemos, este es el primer estudio que examina de forma exclusiva el contenido metálico en la especie *Lactarius deliciosus* en el sur de España y norte de Marruecos.

### 6.1. Propiedades del suelo y contenido metálico

Los hongos basidiomicetos que forman micorrizas, como es el caso de *Lactarius deliciosus*, se han adaptado para absorber elementos químicos de las partículas minerales del suelo donde fructifican y cederlos a las raíces de la planta con la que se encuentran en simbiosis. De esta forma, cuanto más efectividad tienen aportando elementos nutritivos a la planta, más estrecha se hace esta relación, pudiendo acceder a más azúcares procedentes de la fotosíntesis <sup>46</sup>. Por tanto, debido a que el suelo juega un papel muy importante en la acumulación metálica en setas, en este primer apartado se va a estudiar el contenido en cobre, cromo, zinc y plomo presente en los suelos de fructificación de las muestras de nísalos, así como las propiedades fisicoquímicas de éstos.

Las propiedades fisicoquímicas y los valores medios del contenido metálico de los suelos estudiados se presentan en la Tabla 8. Así mismo, para poder obtener información acerca del conjunto de datos, se ha realizado un análisis de una variable para cada metal y propiedad fisicoquímica analizada con STATGRAPHICS Centurion. En la Tabla 9 se muestra el resumen estadístico de este estudio, donde se presenta el promedio, la desviación estándar (s.d.) y el sesgo y la curtosis estandarizada.

**Tabla 8.** Valores medios del contenido metálico en suelos ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de materia seca,  $n = 3$ ) y propiedades fisicoquímicas (pH y contenido de materia orgánica).

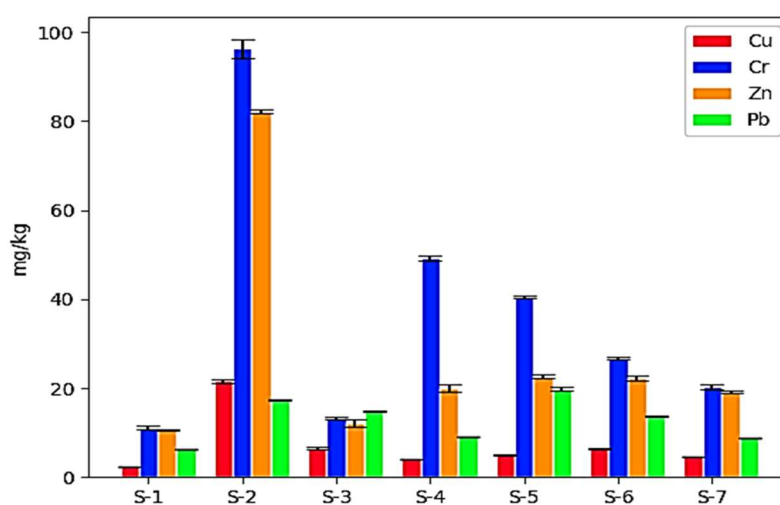
Suelo	Localización	Cu	Zn	Pb	Cr	M.O. (%)	pH
S-1	Bouhachem	$2,38 \pm 0,10$	$10,70 \pm 0,10$	$6,38 \pm 0,03$	$11,10 \pm 0,40$	12,61	5,17
S-2	Chefchaouen	$21,60 \pm 0,30$	$82,20 \pm 0,40$	$17,30 \pm 0,10$	$96,30 \pm 2,10$	26,34	6,68
S-3	D. de las Yeguas	$6,69 \pm 0,28$	$12,20 \pm 0,80$	$14,80 \pm 0,10$	$13,14 \pm 0,30$	23,03	6,11
S-4	Pinar del Rey	$4,14 \pm 0,03$	$20,00 \pm 0,80$	$9,11 \pm 0,07$	$49,30 \pm 0,50$	5,60	6,40
S-5	El Colorado	$5,07 \pm 0,08$	$22,60 \pm 0,40$	$19,90 \pm 0,30$	$40,50 \pm 0,30$	10,32	6,93
S-6	Palancar	$6,44 \pm 0,05$	$22,30 \pm 0,60$	$13,70 \pm 0,10$	$26,80 \pm 0,40$	9,55	5,53
S-7	Jimena de la Fra.	$4,58 \pm 0,03$	$19,10 \pm 0,30$	$8,82 \pm 0,06$	$20,40 \pm 0,60$	8,40	5,72



**Tabla 9.** Resumen estadístico del análisis de una variable para cada metal en suelos, donde se muestra el promedio, la desviación estándar (s.d.), el coeficiente de variación (%) y el sesgo y la curtosis estandarizada. Los valores han sido obtenidos considerando un nivel de confianza del 95%.

	Promedio (mg·kg <sup>-1</sup> )	s.d.	$\sigma$ (%)	Sesgo	Curtosis
<b>Cu</b>	7,27	6,48	89,20	2,55	3,20
<b>Zn</b>	27,01	24,78	91,73	2,64	3,37
<b>Pb</b>	12,86	4,93	38,37	0,11	-0,75
<b>Cr</b>	36,82	29,69	80,60	1,71	1,41

Como puede observarse, la estrategia de muestreo ha conducido a resultados con variabilidad en cuanto a las propiedades fisicoquímicas del suelo y concentración metálica debido a la heterogeneidad de los emplazamientos investigados. Los suelos de fructificación de *Lactarius deliciosus* analizados son ácidos (pH: 5,17 – 6,93), lo que podría implicar una mayor disponibilidad de metales pesados, y presentan un contenido de materia orgánica que varía notablemente desde valores de 5,60 a 26,34%. La concentración de cobre en los suelos estudiados se presenta en un rango de 2,38 a 21,6 mg·kg<sup>-1</sup>, con una media de 7,27 mg·kg<sup>-1</sup>. El contenido medio en zinc es de 27,01 mg·kg<sup>-1</sup>, con un valor máximo y mínimo de 82,20 y 10,70 mg·kg<sup>-1</sup>, respectivamente. El plomo tiene un valor máximo de 19,90 mg·kg<sup>-1</sup> y un valor mínimo de 6,38 mg·kg<sup>-1</sup>, con una media de 12,86 mg·kg<sup>-1</sup>. Por su parte, el cromo presenta un contenido medio de 36,82 mg·kg<sup>-1</sup> y un rango de valores que oscila entre 11,10 a 96,30 mg·kg<sup>-1</sup>. Según los valores del sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada el cobre y zinc no siguen una distribución normal, mientras que el plomo y cromo sí que siguen una distribución normal. En la Figura 12 se adjunta un gráfico de barras generado con Python 3 usando la librería Matplotlib (Código Fuente en el *Apéndice III*) que permite visualizar de forma gráfica el contenido metálico en las muestras de suelos.



**Figura 12.** Gráfico de barras de las concentraciones metálicas de los suelos de las distintas localizaciones geográficas.

Dentro del conjunto de datos, el contenido de cobre de la muestra S-2 (inmediaciones a Chefchaouen) se considera como un valor atípico, mientras que el contenido de cromo y zinc en esta misma muestra son considerados valores extremos (Figura 13). La mayor concentración de estos tres metales pesados en esta localización se debería a la proximidad de las muestras de suelos a una zona de carretera, que constituye un foco principal de contaminación, puesto que, como apunta Gunawardena y col. <sup>66</sup>, las emisiones relacionadas con el tráfico son la principal fuente de zinc, cobre y cromo en la atmósfera urbana, pudiéndose acumular por deposición en los suelos.

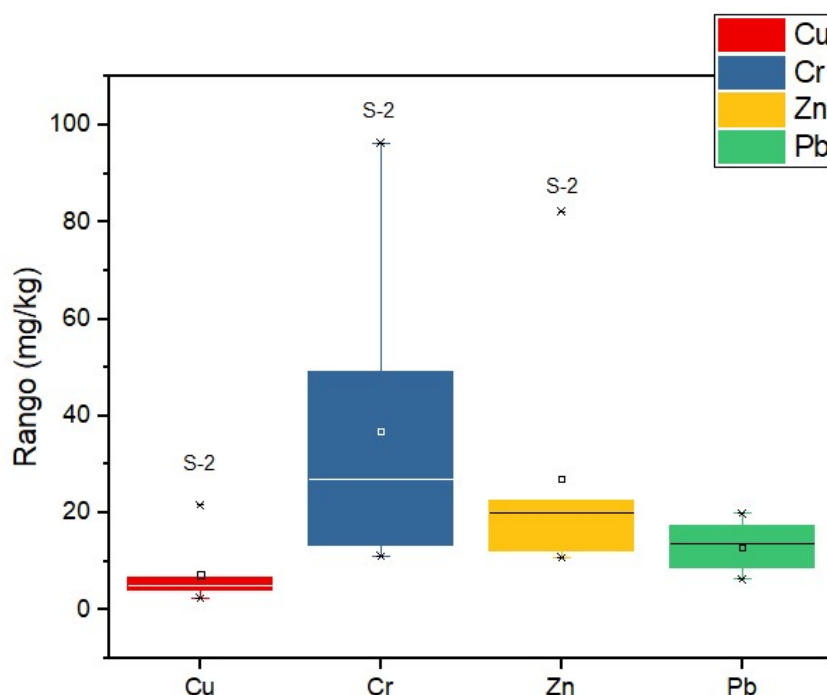


Figura 13. Diagrama de cajas y bigotes para el contenido en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de cromo, cobre, zinc y plomo en suelos.

### 6.1.1. Similitud en cuanto a Cu, Zn, Pb y Cr en las muestras de suelos

Debido a la variabilidad de los datos, se ha llevado a cabo un estudio estadístico para identificar las regiones más similares en términos de acumulación de metales en suelos, así como que metales afectan más a cada zona. Por tanto, en primer lugar, se ha realizado un análisis de clúster jerárquico (ACJ) con OriginPro 2017 para agrupar las localizaciones geográficas en función de su similitud con respecto al contenido en cobre, cromo, zinc y plomo.

Observando el dendrograma resultante de la Figura 14, se puede comprobar que hay tres clústers principales. El primer clúster está constituido por muestras procedentes de localizaciones geográficas que no se encuentran próximas a focos de contaminación, como carreteras y núcleos industriales. Estas localizaciones que conforman el primer clúster son la Reserva Natural de Bouhachem (S-1), el Pinar de la Dehesa de las Yeguas (S-3), el Sendero del Palancar (S-6) y Jimena de la Frontera (S-7). El segundo clúster estaría integrado por las muestras del Pinar del Rey (S-4) y del Pinar del Colorado (S-5). Estas

zonas se caracterizan por encontrarse cercanas a núcleos industriales, como es el Pinar del Rey, y a carreteras y núcleos urbanos, como es el Pinar del Colorado. Por su parte, el tercer clúster estaría formado por la muestra de suelo procedente de las inmediaciones a Chefchaouen (S-2), que se comprueba que difiere considerablemente del resto de las localizaciones estudiadas (Figura 14) debido a que esta zona de muestreo se encontraba próxima a un foco de contaminación como es una carretera con alta densidad de tráfico.

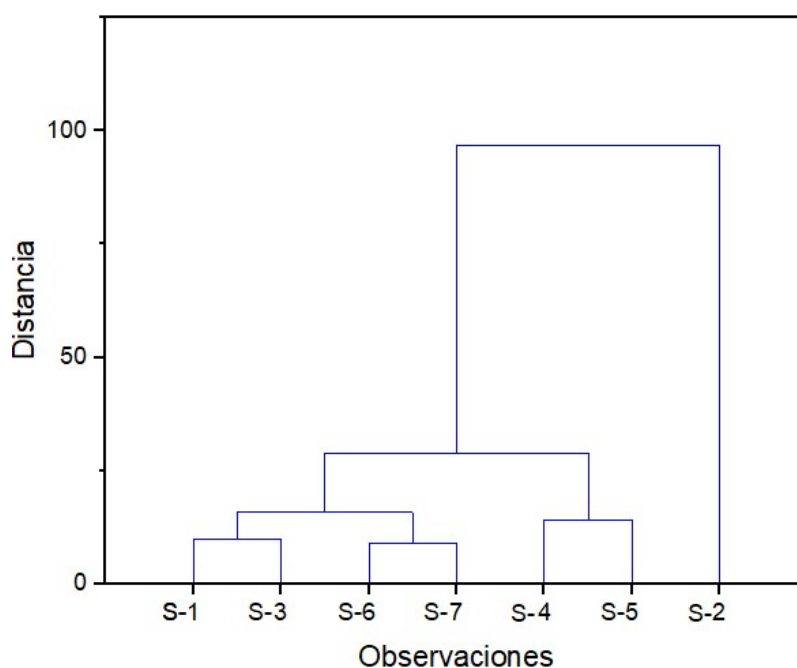


Figura 14. Dendrograma para el contenido metálico en los suelos de fructificación.

Una vez conocidas las similitudes en cuanto al contenido metálico en las distintas localizaciones, se utilizó OriginPro 2017 para llevar a cabo un análisis de componentes principales (ACP) que permitiera esclarecer qué metal o metales afectan más a cada zona. Esta técnica quimiométrica permite transformar un amplio conjunto de variables (en este caso todas las medidas realizadas con ICP-MS para determinar el contenido metálico), en un conjunto reducido de nuevas variables que expliquen la mayor parte de la variación entre los datos.

El modelo de ACP obtenido generó cuatro componentes principales y reveló que el 96,05% de la variabilidad acumulada entre los datos podría explicarse con los dos primeros componentes, por lo que los componentes principales restantes, al explicar una proporción muy pequeña de la variabilidad, se pueden obviar. A partir del análisis de componentes principales (APC) se ha obtenido el gráfico Biplot (Figura 15), con el que es posible saber cómo la variable afecta o influye sobre cada componente principal. Para ello es necesario tener en cuenta que, valores próximos a 1 o -1 indican que la variable afecta considerablemente sobre la componente.

Observando la Figura 15 se comprueba que la componente principal 2 (PC2) estaría afectada considerablemente por el plomo (Pb), mientras que el cobre (Cu), cromo (Cr) y zinc (Zn) son más influyentes sobre la componente principal 1 (PC1), aunque no en un grado tan alto como el plomo en la PC2. Atendiendo al gráfico, se puede ver que la principal diferencia entre el Pinar de la Dehesa de las Yeguas (S-3), el Pinar del Colorado (S-5) y el Sendero del Palancar (S-6) con el resto de las localizaciones geográficas es el contenido en plomo. Sin embargo, no se observan grandes diferencias en cuanto al contenido de este metal en la Reserva Natural de Bouhachem (S-1), las inmediaciones a Chefchaouen (S-2), el Pinar del Rey (S-4) y Jimena de la Frontera (S-7), por lo que éstas presentan similitud en cuanto a concentraciones de plomo. Considerando ahora estas últimas localizaciones nombradas, se puede observar que se separan en función de la PC1, por lo que el contenido en cobre, cromo y zinc varía entre estas localizaciones, comprobándose que las inmediaciones a Chefchaouen (S-2), es la que más difiere en cuanto a concentración de estos tres metales con respecto a la Reserva Natural de Bouhachem (S-1), el Pinar del Rey (S-4) y Jimena de la Frontera (S-7).

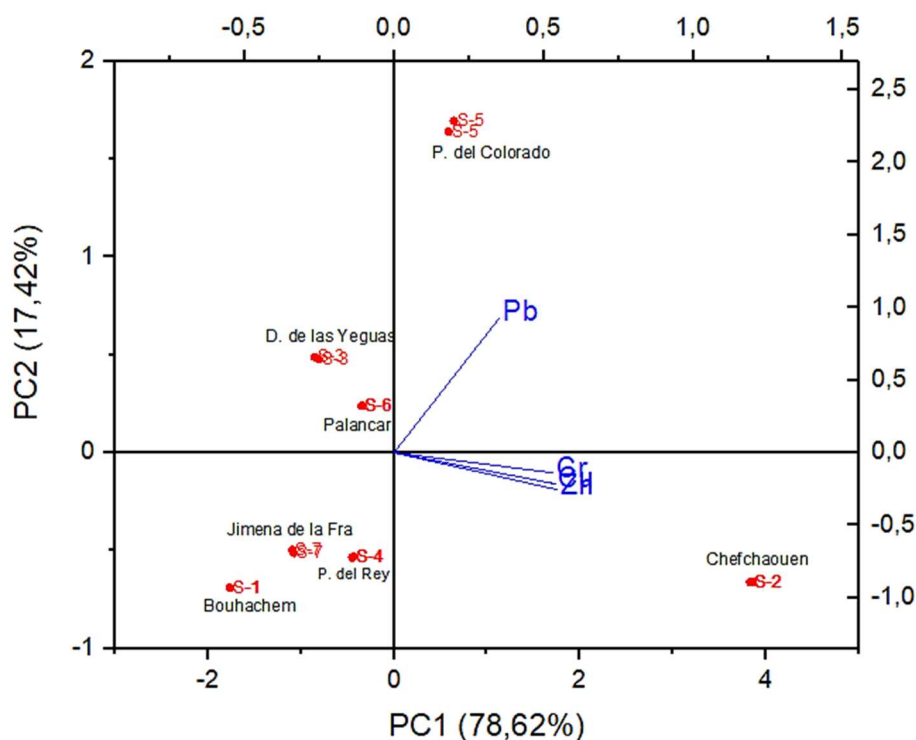


Figura 15. Gráfico Biplot obtenido en el análisis de componentes principales (ACP).

### 6.1.2. Procedencia del contenido metálico en muestras de suelos

Otro aspecto importante que permite analizar el modelo de ACP generado son las correlaciones entre los cuatro metales. Para ello, se atiende a la matriz de correlación (*Apéndice IV*, Tabla A2) y al gráfico de influencias (*Apéndice IV*, Figura A1), donde se puede ver que el cromo, cobre y zinc están relacionados entre sí (es decir: Cr – Zn, Cr – Cu y Cu – Zn), sugiriendo así que estos metales podrían presentar un origen común (natural o antropogénico). El plomo, por su parte, no presenta correlación

con el resto de los metales, por lo que el origen de este metal podría ser diferente al del cromo, cobre y zinc en las muestras de suelos.

No obstante, para poder establecer si el origen de los metales pesados estudiados es antropogénico o está influenciado por factores fisicoquímicos del suelo será necesario determinar las posibles correlaciones entre los analitos y el pH, así como con el contenido de materia orgánica. De esta forma se ha llevado a cabo un análisis de regresión lineal simple con STATGRAPHICS Centurion entre cada uno de los metales con el pH y con el contenido de materia orgánica. En la Tabla 10 se muestran los coeficientes de correlación ( $r$ ) obtenidos y el  $p$ -valor de cada caso concreto. En vista de los resultados, se puede decir que el pH está correlacionado a un nivel de confianza del 95% de forma débil ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) con el plomo, mientras que el porcentaje de materia orgánica se correlaciona débilmente ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) con el cobre, lo que indicaría que su disponibilidad en el suelo se vería afectada por este factor fisicoquímico. Para el resto de los metales (Zn y Cr), la falta de correlación obtenida con respecto al contenido de materia orgánica y pH indica que podrían proceder mayoritariamente de actividades antropogénicas.

**Tabla 10.** Coeficientes de correlación y  $p$ -valor obtenidos en el análisis de regresión lineal simple en suelos. Los valores han sido obtenidos considerando un nivel de confianza del 95%.

	Cu		Zn		Pb		Cr	
	$r$	$p$ -valor	$r$	$p$ -valor	$r$	$p$ -valor	$r$	$p$ -valor
<b>M.O.</b>	<b>0,7564</b>	<b>0,0485</b>	0,6082	0,1474	0,45345	0,3058	0,4117	0,3588
<b>pH</b>	0,04667	0,2911	0,4946	0,2591	<b>0,7615</b>	<b>0,0467</b>	0,6765	0,0951

### 6.1.3. Evaluación de los niveles de contaminación

Para completar el estudio de las muestras de suelos y localizaciones geográficas, se ha llevado a cabo una comparación entre las concentraciones medias de Cu, Zn, Pb y Cr en las muestras de suelo con respecto a los límites máximos permitidos propuestos por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España en el BOE núm. 262 (1990) y por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía en su informe sobre los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado (1999). Los límites máximos permitidos se exponen en la Tabla 11 en concentraciones de  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (peso seco). También se muestran las concentraciones medias experimentales de Cu, Zn, Cr y Pb correspondientes a las muestras de suelos de las localizaciones geográficas estudiadas en este Trabajo Fin de Máster.

Mediante la comparativa entre las concentraciones medias experimentales de cada uno de los metales estudiados con los límites máximos permitidos se puede comprobar que todas las muestras se encuentran dentro de los intervalos. Así pues, se establece que los suelos muestreados en las distintas localizaciones del sur de España y norte de Marruecos no se encuentran contaminados por cobre, zinc,

cromo y plomo, y, por tanto, las localizaciones geográficas estudiadas resultan ser áreas limpias con respecto a estos cuatro metales en base a la legislación vigente. No obstante, sería necesario resaltar el contenido en cromo en las inmediaciones a Chefchaouen, el cual es de  $96,30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (materia seca). Comparando este valor con el de los límites máximos se puede ver que el contenido en cuanto a este metal es elevado. A pesar de ello, la no superación del límite máximo permitido hace que esta zona no se pueda considerar contaminada por cromo.

**Tabla 11.** Comparación de las concentraciones medias experimentales de los suelos con los límites máximos permitidos.

<b>Límites Permisibles</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Pb</b>	<b>Cr</b>
Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; para suelos con $\text{pH} < 7$ )	50	150	50	100
Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; para suelos con $\text{pH}$ entre 5 y 7)	< 50	< 200	< 100	< 100

<b>Concentraciones Experimentales (<math>\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Pb</b>	<b>Cr</b>
<i>Reserva Natural de Bouhachem (Marruecos)</i>	2,38	10,70	6,38	11,10
<i>Inmediaciones a Chefchaouen (Marruecos)</i>	21,60	82,20	17,30	96,30
<i>Pinar de Dehesa de las Yeguas (Puerto Real)</i>	6,69	12,20	14,80	13,40
<i>Pinar del Rey (San Roque)</i>	4,14	20,00	9,11	49,30
<i>Pinar del Colorado (Conil de la Frontera)</i>	5,07	22,60	19,90	40,50
<i>Sendero del Palancar (Parque Natural de los Alcornocales)</i>	6,44	22,30	13,70	26,80
<i>Jimena de la Frontera (Sierra de Cádiz)</i>	4,58	19,10	8,82	20,40

## 6.2. Estudio de la bioacumulación metálica en *Lactarius deliciosus*

Como se sabe, la presencia de metales pesados en el medio ambiente es un asunto relevante debido a su claro impacto negativo en la vida silvestre y en la salud humana. Como se ha ido comentando a lo largo de la Memoria, las setas silvestres tienen la capacidad de acumular altas concentraciones, llegando a presentar niveles mayores que los del suelo donde fructifican. Así pues, el estudio de la bioacumulación metálica en setas es de gran importancia.

En este nuevo apartado se va a presentar el estudio de la bioacumulación metálica en muestras de níscalos recolectados en las distintas localizaciones del sur de España y norte de Marruecos. Para ello, se va a exponer el contenido metálico presente en las muestras, los resultados referentes al cálculo de



los factores de bioconcentración y el estudio estadístico que permite establecer en qué grado afecta el contenido metálico en los suelos, el pH y el porcentaje de materia orgánica en la bioacumulación de estos cuatro metales en la especie *Lactarius deliciosus*.

### 6.2.1. Contenido metálico en *Lactarius deliciosus*

Las concentraciones medias en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (peso seco) de cobre, zinc, cromo y plomo presentes en las siete muestras de *Lactarius deliciosus* junto con su desviación estándar ( $n = 3$ ) se exponen en la Tabla 12. Por otro lado, para poder obtener información acerca del conjunto de datos, se ha realizado un estudio de una variable para cada metal. En la Tabla 13 se muestra el resumen estadístico de este estudio, donde se presenta el promedio, la desviación estándar (s.d.), el coeficiente de variación y el sesgo y la curtosis estandarizada.

**Tabla 12.** Valores medios del contenido metálico en *Lactarius deliciosus* ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , peso seco) con sus desviaciones estándar s.d. ( $n = 3$ ).

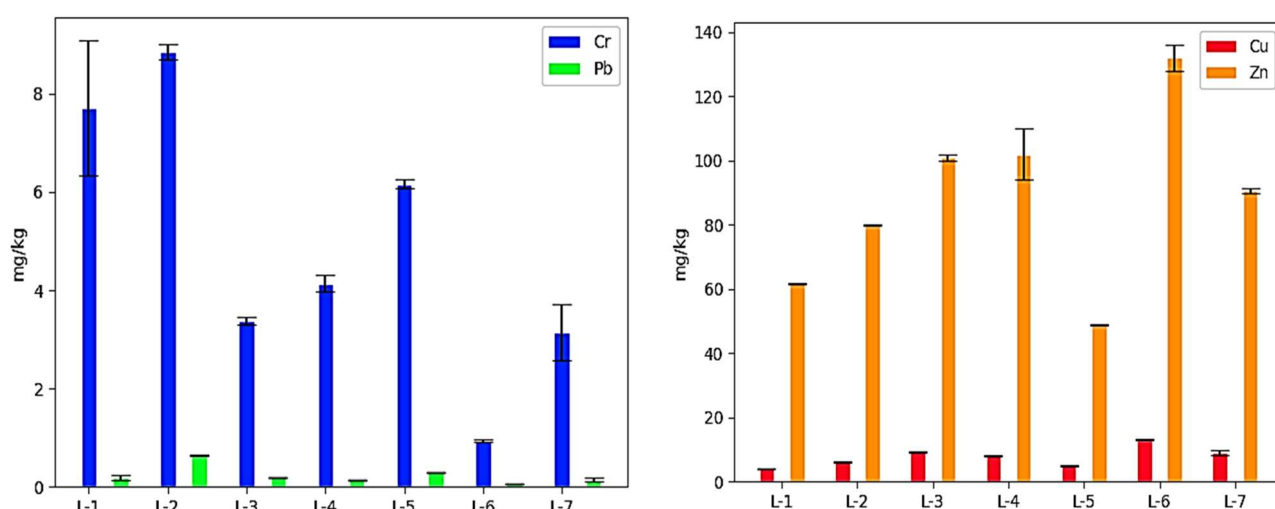
<i>L. deliciosus</i>	Localización	Cu	Zn	Pb	Cr
<i>L-1</i>	Bouhachem	$3,94 \pm 0,04$	$61,70 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,05$	$7,70 \pm 1,38$
<i>L-2</i>	Chefchaouen	$6,24 \pm 0,12$	$79,80 \pm 0,20$	$0,64 \pm 0,01$	$8,85 \pm 0,15$
<i>L-3</i>	D. de las Yeguas	$9,45 \pm 0,19$	$101,00 \pm 1,00$	$0,19 \pm 0,002$	$3,38 \pm 0,07$
<i>L-4</i>	Pinar del Rey	$8,13 \pm 0,37$	$102,00 \pm 8,00$	$0,15 \pm 0,003$	$4,14 \pm 0,17$
<i>L-5</i>	El Colorado	$5,07 \pm 0,09$	$48,70 \pm 0,20$	$0,31 \pm 0,01$	$6,16 \pm 0,10$
<i>L-6</i>	Palancar	$13,00 \pm 0,20$	$132,00 \pm 4,00$	$0,07 \pm 0,00$	$0,94 \pm 0,03$
<i>L-7</i>	Jimena de la Fra.	$9,09 \pm 0,96$	$90,5 \pm 0,90$	$0,15 \pm 0,04$	$3,15 \pm 0,57$

**Tabla 13.** Resumen estadístico del análisis de una variable para cada metal en muestras de *Lactarius deliciosus*, donde se muestra el promedio, la desviación estándar (s.d.), el coeficiente de variación (%) y el sesgo y la curtosis estandarizada. Los valores han sido obtenidos considerando un nivel de confianza del 95%.

	Promedio ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	s.d.	$\sigma$ (%)	Sesgo	Curtosis
<b>Cu</b>	7,85	3,06	39,05	0,51	-0,02
<b>Zn</b>	87,96	27,72	31,52	0,13	-0,06
<b>Pb</b>	0,24	0,19	77,30	2,08	2,20
<b>Cr</b>	4,90	2,79	56,85	0,16	-0,55

Como se puede observar, la concentración de cobre en las muestras estudiadas se presenta en un rango de 3,94 a 13,00 mg·kg<sup>-1</sup>, con una media de 7,85 mg·kg<sup>-1</sup>. El contenido medio en zinc es de 87,96 mg·kg<sup>-1</sup>, con un valor máximo y mínimo de 132,00 y 48,70 mg·kg<sup>-1</sup>, respectivamente. El plomo tiene un valor máximo de 0,64 mg·kg<sup>-1</sup> y un valor mínimo de 0,07 mg·kg<sup>-1</sup>, con una media de 0,24 mg·kg<sup>-1</sup>. El cromo presenta un contenido medio de 4,90 mg·kg<sup>-1</sup> y un rango de valores que oscila entre 0,94 a 8,85 mg·kg<sup>-1</sup>. Según los valores del sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada la distribución de estos metales es normal, a excepción del plomo. Llevando a cabo un análisis global se establece que el orden creciente de contenido metálico en las muestras de *Lactarius deliciosus* es el siguiente: Pb < Cr < Cu < Zn.

En la Figura 16 se adjuntan diagramas de barras generados con Python 3 usando la librería Matplotlib (Código Fuente en *Apéndice V*) que permiten visualizar de forma gráfica los resultados obtenidos en cuanto a contenido de metales esenciales y no esenciales en las muestras de *Lactarius deliciosus*. Por simple inspección visual de los resultados se puede ver que el contenido más elevado en cobre registrado es el de la muestra recolectada en el Sendero del Palancar (L-6), y el más bajo es el determinado en la muestra L-1, procedente de la Reserva Natural de Bouhachem. Para el zinc se ha observado que las muestras que presentan una mayor concentración son las del Pinar de Dehesa de las Yeguas (L-3), el Pinar del Rey (L-4) y Sendero del Palancar (L-6). Las concentraciones más bajas para este metal han sido las de la muestra procedente del Pinar del Colorado (L-5). En cuanto al plomo, la muestra recolectada en las inmediaciones a Chefchaouen (L-2) es la que presenta una mayor concentración. La muestra con un menor contenido de plomo se corresponde con la muestra L-6, procedente del Sendero del Palancar. Finalmente, las muestras L-1 y L-2, ambas recolectadas en el norte de Marruecos, son las que presentan un mayor contenido en cromo. La muestra L-6 del Sendero del Palancar es la que tiene una menor concentración con respecto a este metal pesado.



**Figura 16.** Diagrama de barras del contenido metálico en muestras de *Lactarius deliciosus*. A la izquierda se representa el contenido de metales no esenciales en las muestras y a la derecha el contenido de metales esenciales.

### 6.2.2. Comparativa del contenido metálico entre éste y otros estudios

En primer lugar, los resultados obtenidos en cuanto al contenido en cobre, zinc, plomo y cromo han sido comparados con otros estudios encontrados en la bibliografía que han investigado la concentración de estos metales en muestras de *Lactarius deliciosus* en distintas áreas geográficas como son otras regiones de España, Grecia y Polonia.

Campos y col.<sup>47</sup> evaluaron la acumulación de 19 metales, entre ellos cobre, zinc, cromo y plomo, en 15 especies de setas recolectadas en enclaves forestales de Ciudad Real (España). Los resultados obtenidos para las muestras de níscalos señalan que las concentraciones de cromo ( $13,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), cobre ( $31,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y plomo ( $3,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) fueron más elevadas que las obtenidas en esta investigación. Sin embargo, el contenido de zinc ( $107,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) sí se encontró dentro del rango observado en las muestras del sur de España y norte de Marruecos. No obstante, Campos y col. confirman que la especie *Lactarius deliciosus* tiene un mayor contenido en zinc y cobre y menores concentraciones de cromo y plomo. Otros autores españoles, Alonso y col.<sup>44</sup>, analizaron el contenido en cobre y zinc en el sombrero y pie de 28 especies que fueron recolectadas en zonas urbanas, agrícolas y forestales de Lugo (España). Sus resultados apuntan que las concentraciones para el cobre (sombrero:  $32,62 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; pie:  $18,55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) y zinc (sombrero:  $152,20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; pie:  $309,80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) son más elevadas que las examinadas en las muestras andaluzas y de Marruecos. Pero, al igual que Campos y col., corroboran que la especie *Lactarius deliciosus* presenta un mayor contenido en zinc. En base a la comparación con estos dos estudios se puede extraer que las muestras del sur de España y norte de Marruecos presentan un menor contenido en cromo, plomo, cobre y zinc con respecto a las procedentes del centro y norte de España. Sin embargo, coinciden en el orden en cuanto a contenido metálico:  $\text{Pb} < \text{Cr} < \text{Cu} < \text{Zn}$ .

En la región de la isla de Lesbos (Grecia), Aloupi y col.<sup>15</sup> estudiaron el contenido de 8 metales pesados en cinco especies de setas. Se ha observado que estos autores reportan contenidos más bajos para el cromo ( $0,04 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) en *Lactarius deliciosus* con respecto a los descritos en el presente estudio. Por su parte, el contenido en cobre, plomo y zinc ( $6,9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;  $0,126 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ;  $81,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivamente) se encuentra en el rango medio observado en las muestras del sur de España y norte de Marruecos. Los datos aportados por Aloupi y col. ratifican que la especie *Lactarius deliciosus* presenta menores niveles de cromo y plomo y un mayor contenido en zinc y cobre. El hecho de que la especie *Lactarius deliciosus* posea un mayor contenido en zinc también es confirmado con el estudio llevado a cabo por Mirosław Mleczek y col.<sup>49</sup>, que estimaron el contenido de 8 elementos traza en 6 especies de setas, entre las que se encontraba el níscolo, procedentes de diferentes regiones de Polonia.

Así pues, independientemente de la región geográfica donde se hayan recolectado las muestras, la especie de *Lactarius deliciosus* presenta mayores niveles de zinc y cobre, siendo este primero el que se encuentra en mayor concentración, y menores niveles de cromo y plomo, donde es este último el que se encuentra a concentraciones más bajas.

### 6.2.3. Factores de bioconcentración

El estudio de la bioacumulación de Cu, Zn, Cr y Pb en las muestras de *Lactarius deliciosus* con respecto al suelo donde éstas fructificaron se ha llevado a cabo mediante el cálculo de los factores de bioconcentración (BCF) para cada metal, que se recuerda que es el cociente entre el contenido del metal en la muestra de seta y el contenido del metal en la muestra de suelo. Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 14.

En base a los resultados se puede comprobar que todas las muestras de *Lactarius deliciosus* son bioacumuladoras de zinc y cobre ( $BCF > 1$ ). Sólo en un caso aislado (L-2) se ha obtenido que la muestra sea bioexclusora para el cobre. Para el resto de los metales (Cr y Pb) las muestras de *Lactarius deliciosus* han resultado ser bioexclusoras ( $BCF < 1$ ), especialmente para el caso del plomo. De este modo, se puede decir que las muestras de níscalos recolectados en las distintas localizaciones del sur de España y norte de Marruecos tienden a bioacumular estos dos metales esenciales: cobre y zinc.

**Tabla 14.** Factores de bioconcentración para las muestras de *L. deliciosus*. Los resultados en rojo indican que la muestra de *L. deliciosus* es bioacumuladora para el metal ( $BCF > 1$ ).

<i>L. deliciosus</i>	Localización	Cu	Zn	Pb	Cr
L-1	Bouhachem	1,67	5,79	0,03	0,69
L-2	Chefchaouen	0,29	1,00	0,04	0,09
L-3	D. de las Yeguas	1,41	8,31	0,01	0,25
L-4	Pinar del Rey	1,96	5,08	0,02	0,08
L-5	El Colorado	1,00	2,16	0,02	0,15
L-6	Palancar	2,02	5,93	0,01	0,04
L-7	Jimena de la Fra.	1,98	4,75	0,02	0,15

Alonso y col.<sup>44</sup> estudiaron la bioacumulación de cobre y zinc en 28 especies de hongos comestibles, entre las cuales se encuentra *Lactarius deliciosus*. Los BFC calculados para estos dos metales en el trabajo llevado a cabo por estos autores españoles fueron similares para el cobre y generalmente más altos para el zinc con respecto a los observados en este Trabajo Fin de Máster. En cualquier caso, confirmaron que *Lactarius deliciosus* era una especie bioacumuladora para estos dos metales esenciales. Otros estudios significativos han sido reportados por Campos y col.<sup>47</sup>, también autores españoles, que investigaron el contenido de 19 metales y 15 especies de basidiomicetos, entre ellos *Lactarius deliciosus*. Los factores de bioconcentración calculados por estos investigadores confirman la bioacumulación de zinc y cobre por parte de esta especie de la familia *Russulaceae*. Además, los resultados de Campos y col. coinciden con los de esta investigación en lo referente al plomo y cromo, indicando que la especie *Lactarius deliciosus* es bioexclusora para estos metales tóxicos.



Como se explicó en la introducción de este trabajo, la acumulación de metales pesados en setas puede verse afectada por factores intrínsecos (edad del micelio, etapa de desarrollo, morfología, etc.) y por factores ambientales como son la concentración del metal en el suelo, el pH y el contenido de materia orgánica. Los resultados de un estudio de regresión lineal simple llevado a cabo entre el contenido metálico en las muestras de *Lactarius deliciosus* y el de los suelos donde fructificaron, así como entre el contenido metálico de las muestras de setas y el pH y el contenido de materia orgánica (Tabla 15 y Tabla 16) han indicado que la acumulación metálica es especie-dependiente para el cromo y zinc. Es decir, la acumulación de estos metales pesados en esta especie de seta está afectada por factores intrínsecos. Por otro lado, la acumulación de plomo y cobre en *Lactarius deliciosus* está influenciada por factores ambientales puesto que estas concentraciones están correlacionadas débilmente ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) con el pH y el contenido de materia orgánica, respectivamente. En ningún caso se ha visto correlación entre el contenido metálico de las setas con el contenido metálico del suelo.

**Tabla 15.** Coeficientes de correlación obtenidos en el análisis de regresión lineal simple para contenido metálico en setas y suelos y factores fisicoquímicos. Los valores han sido obtenidos considerando un nivel de confianza del 95%.

	Suelos					
<i>L. deliciosus</i>	Cu	Zn	Cr	Pb	pH	M.O. (%)
Cu	-0,0605	-	-	-	0,4667	<b>0,7576</b>
Zn	-	-0,0798	-	-	0,4946	0,6081
Cr	-	-	0,5278	-	0,6765	0,4119
Pb	-	-	-	0,5401	<b>0,7615</b>	0,4548

**Tabla 16.**  $p$ -valor obtenidos en el análisis de regresión lineal simple para contenido metálico en setas y suelos y factores fisicoquímicos. Los valores han sido obtenidos considerando un nivel de confianza del 95%.

	Suelos					
<i>L. deliciosus</i>	Cu	Zn	Cr	Pb	pH	M.O. (%)
Cu	0,8975	-	-	-	0,2911	<b>0,0485</b>
Zn	-	0,8490	-	-	0,2591	0,1474
Cr	-	-	0,2234	-	0,0951	0,3585
Pb	-	-	-	0,2107	<b>0,0467</b>	0,3053

### 6.3. Ingesta diaria estimada: Beneficios y riesgos

Con el fin de determinar si las muestras de *Lactarius deliciosus* recolectadas en el sur de España y norte de Marruecos son seguras o no para el consumo humano, se ha estimado la ingesta diaria de metales para adultos y niños (EDIM) <sup>26</sup> que tendría lugar a través del consumo de nísalos procedentes de estas dos regiones. Este parámetro ha sido calculado según la expresión de la ecuación (VI). Los valores obtenidos para los cuatro metales en cada muestra han sido comparados con los niveles máximos de ingesta diaria para cada metal.

$$EDIM = \frac{C_{metal} \times ID \text{ de setas}}{MC} \quad (VI)$$

Donde  $C_{metal}$  es la concentración del metal en  $mg \cdot kg^{-1}$ ,  $ID$  es la ingesta diaria de setas en  $kg \cdot día^{-1}$  y  $MC$  la masa corporal en kg. De acuerdo con el Comité Científico de la Alimentación de la UE <sup>15</sup> se ha considerado 60 kg como el peso medio de un consumidor adulto. Para los niños, en base a los datos aportados por Igbiri y col. <sup>26</sup>, se ha establecido como peso medio 15 kg. Por otra parte, se ha supuesto una ingesta diaria de setas de 300 g (0,3 kg) de peso fresco, lo que equivaldría a 30 g (0,03 kg) de materia seca <sup>15</sup>.

#### 6.3.1. Ingesta diaria estimada en adultos

En la Tabla 17 se muestran los resultados obtenidos del cálculo de la ingesta diaria estimada de metales en adultos (EDIM) en cada muestra de *Lactarius deliciosus* y una comparativa con los niveles máximos de ingesta tolerables para cada metal.

Como puede comprobarse, el EDIM del cromo oscila entre  $0,0157 - 0,0442 \text{ mg} \cdot día^{-1} \cdot kg^{-1}$  de masa corporal. No obstante, ni la OMS ni la Comisión Europea han establecido los niveles máximos de ingesta tolerables para este metal, por lo que no es posible evaluar los riesgos para la salud que podrían derivar de la ingesta de cromo a través del consumo de nísalos de las áreas geográficas estudiadas. Para el plomo, el EDIM se encuentra dentro del rango de  $0,0007 - 0,0032 \text{ mg} \cdot día^{-1} \cdot kg^{-1}$  de masa corporal. Estos valores de EDIM no superan los niveles máximos de ingesta establecidos por la OMS (2008) <sup>15,67</sup>, por lo que se asume que no existe ningún riesgo potencial para la salud por el consumo de plomo en nísalos por parte de adultos. El EDIM del cobre se encontró en el rango de  $0,0197 - 0,0651 \text{ mg} \cdot día^{-1} \cdot kg^{-1}$ . Estos resultados no violan los niveles máximos de ingesta establecidos por la Comisión Europea (2003) <sup>15,68</sup>. El EDIM para el zinc está en el rango de  $0,2437 - 0,6610 \text{ mg} \cdot día^{-1} \cdot kg^{-1}$  de masa corporal. En comparación con los niveles máximos de ingesta tolerables de la OMS (1982) <sup>69</sup>, los EDIM del zinc se encuentran por debajo del límite establecido. En base a esta comparativa se podría considerar que la ingesta de nísalos recolectados en el sur de España y norte de Marruecos no supondría riesgos para la salud de un consumidor adulto.



**Tabla 17.** Estimación de la ingesta diaria de Cu, Zn, Cr y Pb mediante el consumo de 300 gramos de nísalos por parte de un consumidor de masa corporal media de 60 kg.

EDIM					
(mg·día <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> de masa corporal)					
Muestra	Localización	Cu	Zn	Pb	Cr
L-1	Reserva Natural de Bouhachem (Marruecos)	0,0197	0,3087	0,0010	0,0385
L-2	Inmediaciones a Chefchaouen (Marruecos)	0,0312	0,3989	0,0032	0,0442
L-3	Pinar de la Dehesa de las Yeguas (Puerto Real)	0,0472	0,5060	0,0010	0,0169
L-4	Pinar del Rey (San Roque)	0,0407	0,5086	0,0007	0,0207
L-5	Pinar del Colorado (Conil de la Frontera)	0,0254	0,2437	0,0015	0,0308
L-6	Sendero del Palancar (P. Alcornocales)	0,0651	0,6610	0,0004	0,0047
L-7	Jimena de la Frontera (Sierra de Cádiz)	0,0455	0,4523	0,0007	0,0157
Niveles máximos de ingesta (mg· día <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> de masa corporal)		30 <sup>a</sup>	60 <sup>b</sup>	0,214 <sup>c</sup>	N.D.

<sup>a</sup> Comisión Europea (2003) <sup>15,68</sup>

<sup>b</sup> OMS (1982) <sup>69</sup>

<sup>c</sup> OMS (2008) <sup>15,67</sup>

N.D. = No determinado

Según la OMS (1982) <sup>69</sup> y el Consejo Nacional de Investigación (NRC, 1989) <sup>70</sup> los requerimientos diarios de zinc y cobre que un adulto necesita para el buen funcionamiento de su organismo equivalen a 15 mg·día<sup>-1</sup> y 1 – 2 mg·día<sup>-1</sup>, respectivamente. A la vista de los resultados obtenidos, la muestra de *Lactarius deliciosus* que aportaría un mayor contenido en cuanto a estos dos oligoelementos es la recolectada en el Sendero del Palancar (L-6), en la provincia de Cádiz. El consumo de 300 gramos de nísalos frescos procedentes de esta zona cubriría un 4,41% de los requerimientos diarios de zinc y un 3,26% de los requerimientos diarios de cobre en adultos. Por su parte, los nísalos que aportarían un menor contenido en cobre serían los recolectados en la Reserva Natural de Bouhachem (L-1), en Marruecos, puesto que el consumo de 300 gramos de estos nísalos frescos únicamente cubriría un 1,97% de los requerimientos diarios. Por otro lado, los nísalos procedentes del Pinar del Colorado (L-5) serían los que conferirían un menor aporte de zinc, ya que cubren únicamente un 1,62% de los requerimientos diarios de este oligoelemento. Finalmente, los nísalos recolectados en el Pinar de la Dehesa de las Yeguas (L-3), en el Pinar del Rey (L-4) y en Jimena de la Frontera (L-7) cubrirían un 2,36, 2,30 y 2,04%, respectivamente, de los requerimientos diarios de cobre en adultos. En cuanto al zinc, cubrían un 3,37, 3,39 y 2,83% de los requerimientos diarios.

### 6.3.2. Ingesta diaria estimada en niños

En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos del cálculo de la ingesta diaria estimada de metales en niños (EDIM) para cada muestra de *Lactarius deliciosus* y una comparativa con los niveles máximos de ingesta tolerable para cada metal.

**Tabla 18.** Estimación de la ingesta diaria de Cu, Zn, Cr y Pb mediante el consumo de 300 gramos de nísalos por parte de un consumidor de masa corporal media de 15 kg.

EDIM					
(mg·día <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> de masa corporal)					
Muestra	Localización	Cu	Zn	Pb	Cr
L-1	Reserva Natural de Bouhachem (Marruecos)	0,0788	1,2349	0,1540	0,0040
L-2	Inmediaciones a Chefchaouen (Marruecos)	0,1249	1,5957	0,1770	0,0128
L-3	Pinar de la Dehesa de las Yeguas (Puerto Real)	0,1890	2,0241	0,0675	0,0039
L-4	Pinar del Rey (San Roque)	0,1626	2,0344	0,0827	0,0030
L-5	Pinar del Colorado (Conil de la Frontera)	0,1014	0,9750	0,1233	0,0061
L-6	Sendero del Palancar (P. Alcornocales)	0,2603	2,6438	0,0189	0,0015
L-7	Jimena de la Frontera (Sierra de Cádiz)	0,1819	1,8093	0,0629	0,0029
Niveles máximos de ingesta (mg· día <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> de masa corporal)		3-5 <sup>a</sup>	12-23 <sup>a</sup>	N.D.	N.D.

<sup>a</sup> Academia Nacional de Ciencia, Ingeniería y Medicina (2001) ([www.nap.edu](http://www.nap.edu)) <sup>71</sup>

N.D. = No determinado

A la vista de los resultados, se puede establecer que el EDIM del cobre oscila entre 0,0788 – 0,2603 mg·día<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup> de masa corporal. Los valores obtenidos se encuentran dentro del rango del nivel máximo de ingesta diaria de cobre en niños estipulado por la Academia Nacional de Ciencia, Ingeniería y Medicina (2001) <sup>71</sup>. Por otro lado, el EDIM para el zinc varía de 0,9750 a 2,6438 mg·día<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup> de masa corporal. En comparación con los niveles máximos de ingesta tolerables de la Academia Nacional de Ciencia, Ingeniería y Medicina (2001) <sup>71</sup>, los EDIM del zinc se encuentran dentro del límite. Para el plomo y el cromo no se han encontrado establecidos niveles máximos de ingesta tolerable para niños, por lo que no se han podido evaluar los posibles riesgos que podría desencadenar la ingesta de cromo y plomo a través del consumo de setas procedentes del sur de España y norte de Marruecos.

Finalmente, se ha analizado el aporte de oligoelementos que estos nísalos podrían proporcionar a los niños en base a los requerimientos diarios de cobre y zinc establecidos por la Academia Nacional de



Ciencia, Ingeniería y Medicina (2001) <sup>71</sup>, los cuales son de 0,44 – 0,70 y 5 – 8 mg·día<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup> de masa corporal, respectivamente. En función de los resultados obtenidos, la muestra de *Lactarius deliciosus* que aporta un mayor contenido en metales esenciales (cobre y zinc) es la recolectada en el Sendero del Palancar (L-6). El consumo de 300 g de nísalos frescos procedentes de esta zona cubriría un 37,19% de los requerimientos diarios de cobre y un 33,01% de los requerimientos diarios de zinc en niños. Por su parte, los nísalos que aportarían un menor contenido en cobre serían los recolectados en la Reserva Natural de Bouhachem (L-1), en Marruecos, puesto que el consumo de 300 gramos de estos nísalos frescos únicamente cubriría un 11,14% de los requerimientos diarios. Por otro lado, los nísalos procedentes del Pinar del Colorado (L-5) serían los que conferirían un menor aporte de zinc, ya que cubren únicamente un 12,19% de los requerimientos diarios de este oligoelemento. Finalmente, los nísalos recolectados en el Pinar de la Dehesa de las Yeguas (L-3), en el Pinar del Rey (L-4) y Jimena de la Frontera (L-7) cubrirían un 27,00, 23,23 y 25,98%, respectivamente, de los requerimientos diarios de cobre en niños. En cuanto al zinc, cubrían un 25,30, 25,43 y 22,61% de los requerimientos diarios en niños.

## 7. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos de la investigación llevada a cabo en este Trabajo Fin de Máster, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha adaptado con éxito una nueva metodología de digestión ácida para muestras de setas mediante el empleo de bloque digestor, el cual ha permitido la digestión simultánea de un gran número de muestras obteniéndose unas recuperaciones satisfactorias para los metales analizados.
- La espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) se presenta como la técnica más adecuada para llevar a cabo la cuantificación de varios metales pesados a nivel de trazas en digeridos de setas, debido a su alta selectividad, sensibilidad y su capacidad de análisis multielemental.
- Las técnicas quimiométricas y estadísticas han resultado ser una herramienta útil a la hora de establecer similitudes entre las localizaciones geográficas estudiadas en función del contenido metálico. Del mismo modo, han demostrado ser eficaces a la hora de establecer la procedencia de los metales pesados en suelos de fructificación, así como los factores que afectan a la bioacumulación metálica en las muestras recolectadas de *Lactarius deliciosus*.
- A partir de la comparativa del contenido metálico en suelos con los límites máximos permitidos establecidos por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España y la Consejería de Medio Ambiente de Andalucía, se ha podido determinar que las áreas geográficas muestreadas no presentan contaminación por plomo, cromo, cobre y zinc.
- El estudio del contenido metálico en las siete muestras de *Lactarius deliciosus* ha mostrado que presentan niveles de cobre, cromo y plomo, en general, más bajos que los reportados en los estudios llevados a cabo en el norte de España. Por su parte, el contenido en zinc en las muestras de *Lactarius deliciosus* de este estudio se encuentra en el rango de los niveles observados en las investigaciones de dichos autores españoles.
- El cálculo de los factores de bioconcentración (BFC) ha indicado que la especie *Lactarius deliciosus* es bioacumuladora para zinc y cobre, y bioexclusora para plomo y cromo. Estos resultados están en concordancia con los reportados por distintos estudios significativos que han tenido lugar en otras zonas de España.
- Tanto los factores fisicoquímicos del suelo (pH y contenido de materia orgánica) como los factores intrínsecos de la especie parecen afectar a la bioacumulación metálica en *Lactarius deliciosus*, aunque no de manera uniforme.
- La ingesta diaria estimada de metales (EDIM) que tendría lugar a través del consumo de níscales de las distintas localizaciones estudiadas en el sur de España y norte de Marruecos no parece plantear ninguna amenaza para la salud de los adultos. Aunque se requiere de niveles máximos de ingesta



tolerable de cromo para poder confirmar con exactitud esta afirmación. En el caso de los niños, la falta de niveles máximos de ingesta diaria de cromo y plomo ha imposibilitado llevar a cabo una evaluación de los posibles riesgos del consumo de setas procedentes de estas áreas geográficas.

- A través de la comparativa de los resultados obtenidos de la ingesta diaria estimada de metales (EDIM) con los requerimientos diarios, se ha podido establecer que los níscalos procedentes del Sendero del Palancar son los que confieren un mayor aporte de cobre y zinc. No obstante, no llegan a cubrir completamente los requisitos diarios de estos dos oligoelementos, por lo que el consumo de estas setas deberá de ir acompañado de alimentos que contribuyan a alcanzar dichos valores, tanto en niños como en consumidores adultos.

## 8. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Este Trabajo Fin de Máster constituye el inicio de una nueva línea de investigación: “Mapa Andaluz de Compuestos Bioactivos y Metales en Setas Silvestres” llevada a cabo por el grupo de investigación de AGR-122 del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, el cual cuenta con la colaboración del Departamento de Biología de la Universidad de Abdelmalek Essaadi (Marruecos) y de la Asociación Micológica del Estrecho Mairei.

Con los resultados de las investigaciones realizadas dentro de esta nueva línea se pretende dar conocimiento y valor sobre aspectos de calidad de las setas silvestre de Andalucía, de las que apenas hay estudios realizados en la actualidad. Para ello, el objetivo es analizar diferentes parámetros como son: compuestos de interés biológico (flavonoides, carotenoides, vitaminas, compuestos fenólicos totales, etc.) y contenido en metales esenciales y no esenciales en diferentes especies de setas de interés gastronómico, como son *Boletus aereus*, *Macrolepiota procera*, *Amanita caesarea*, etc. Todas estas variables aportarán información relevante acerca de qué setas serán las de más calidad desde un punto de vista nutricional. De esta manera, se podrá establecer finalmente cuáles son las mejores zonas de recolección de setas en Andalucía en función de la calidad de éstas y su seguridad alimentaria.

En concreto, dentro de las perspectivas futuras de este Trabajo Fin de Máster, se plantean como las más interesantes por sus buenas expectativas las que se enumeran a continuación:

- Publicar los resultados obtenidos en una revista internacional de alto índice de impacto (“Food Chemistry”, “Agronomy”, “Food and Chemical Toxicology”, “Science of the Total Environment”, etc.)
- Presentar una comunicación oral y una comunicación en formato póster dentro de la temática “Alimentación Saludable y Medio Ambiente” en el I Congreso Nacional de Trabajos Fin de Grado y Trabajos Fin de Máster de contenido ambiental, organizado por la Universidad de Burgos.
- Divulgar los resultados del estudio en las VII Jornadas Micológicas del Estrecho, llevadas a cabo por la Asociación Micológica del Estrecho Mairei, la cual participa y colabora en este proyecto.
- Exponer el fruto de este trabajo en distintas redes sociales (Researchgate, Facebook, Twitter, Instagram).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T. & Paredes-López, O. Edible mushrooms: Improving human health and promoting quality life. *Int. J. Microbiol.* **2015**, 1–14 (2015).
2. Bilal, A. W., R, H. B. & A, H. W. Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *J. Med. Plants Res.* **4**, 2598–2604 (2016).
3. Archivo: *Maler der Grabkammer des Amenemhêt 001.jpg* /. (Fuente: The York Project: 10.000 Meisterwerke der Malerei. DVD- ROM., 2002).
4. Moreno Arroyo, B., Gómez Fernández, J. & Pulido Calmaestra, E. *Setas Comestibles de Andalucía*. (Junta de Andalucía, 2013).
5. Mattila, P., Suonpää, K. & Piironen, V. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition* **16**, 694–696 (2000).
6. Moreno, G., García Manjón, J. L. & Zugaza, A. *La guía de INCAFO de los hongos de la Península Ibérica*. (INCAFO, 1986).
7. Ramirez Anguiano, A. Tesis Doctoral: Estudio de las propiedades bioactivas de hongos comestibles para el diseño de productos cárnicos funcionales. (Universidad Autónoma de Madrid, 2009).
8. Bernaś, E., Jaworska, G. & Lisiewska, Z. Edible Mushrooms As a Source of Valuable Nutritive Constituents. *ACTA Acta Sci. Pol., Technol. Aliment* **5**, 5–20 (2006).
9. Becerra Parra, M. & Robles Domínguez, E. *Las setas de la provincia de Cádiz. 100 especies para conocer su riqueza micológica*. (La Serranía, 2009).
10. Kashangura, C., Kunjeku, E., Mabveni, A. R. S., Mswaka, A. & Manjonjo-Dalu, V. *Biotechnology Trust of Zimbabwe 2004 Mushroom Production Manual. Journal of Visual Languages & Computing* (Benaby Printing and Publishing Pvt Ltd, 2005). doi:10.13140/2.1.5107.8727
11. Muszyńska, B., Grzywacz-Kisielewska, A., Kała, K. & Gdula-Argasińska, J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms: A review. *Food Chem.* **243**, 373–381 (2018).
12. Lalotra, P., Gupta, D., Yangdol, R., Sharma, Y. & Gupta, S. Bioaccumulation of heavy metals in the sporocarps of some wild mushrooms. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* **6**, 159–165 (2016).
13. Ouzouni, P. K., Petridis, D., Koller, W. D. & Riganakos, K. A. Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chem.* **115**, 1575–1580 (2009).
14. Islam, T., Yu, X. & Xu, B. Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. *LWT - Food Sci. Technol.* **72**, 423–431 (2016).
15. Aloupi, M., Koutrotsios, G., Koulousaris, M. & Kalogeropoulos, N. Trace metal contents in wild edible mushrooms growing on serpentine and volcanic soils on the island of Lesbos, Greece. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **78**, 184–194 (2012).
16. Melgar, M. J., Alonso, J. & García, M. A. Cadmium in edible mushrooms from NW Spain: Bioconcentration factors and consumer health implications. *Food Chem. Toxicol.* **88**, 13–20 (2016).
17. Demirbaş, A. Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing in the East Black Sea region. *Food Chem.* **75**, 453–457 (2001).

18. Espada Bellido, E. Tesis Doctoral: Diseño y Optimización de Nuevos Sistemas de Análisis de Metales Pesados en Aguas mediante Voltamperometría de Redisolución Adsorbtiva y Sensores Ópticos. (Universidad de Cádiz, 2010).
19. Berkowitz, B., Dror, I. & Yaron, B. Characterization of the Subsurface Environment. in *Contaminant Geochemistry* 3–28 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-54777-5\_1
20. Záhorcová, Z., Árvay, J., Hauptvogel, M., Tomáš, J. & Harangozo, L. Heavy metals determination in edible wild mushrooms growing in former mining area - Slovakia: Health risk assessment. *Potravinárstvo* **10**, 37–46 (2016).
21. Galán Huertos, E. & Romero Baena, A. Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Macla* **10**, 48–60 (2008).
22. Zhu, F. *et al.* Assessment of heavy metals in some wild edible mushrooms collected from Yunnan Province, China. *Environ. Monit. Assess.* **179**, 191–199 (2011).
23. Liu, B. *et al.* Study of heavy metal concentrations in wild edible mushrooms in yunnan province, China. *Food Chem.* **188**, 294–300 (2015).
24. Demirbaş, A. Heavy metal bioaccumulation by mushrooms from artificially fortified soils. *Food Chem.* **74**, 293–301 (2001).
25. Damodaran, D., Vidya Shetty, K. & Raj Mohan, B. Uptake of certain heavy metals from contaminated soil by mushroom-*Galerina vittiformis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **104**, 414–422 (2014).
26. Igbiri, S. *et al.* Edible Mushrooms from Niger Delta, Nigeria with Heavy Metal Levels of Public Health Concern: A Human Health Risk Assessment. *Recent Pat. Food. Nutr. Agric.* **9**, 31–41 (2018).
27. Kokkoris, V., Massas, I., Polemis, E., Koutrotsios, G. & Zervakis, G. I. Accumulation of heavy metals by wild edible mushrooms with respect to soil substrates in the Athens metropolitan area (Greece). *Sci. Total Environ.* **685**, 280–296 (2019).
28. Gucia, M. *et al.* Multivariate analysis of mineral constituents of edible Parasol Mushroom (*Macrolepiota procera*) and soils beneath fruiting bodies collected from Northern Poland. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **19**, 416–31 (2012).
29. Giannaccini, G. *et al.* The trace element content of top-soil and wild edible mushroom samples collected in Tuscany, Italy. *Environ. Monit. Assess.* **184**, 7579–95 (2012).
30. Falandysz, J., Gucia, M., Skwarzec, B., Frankowska, A. & Klawikowska, K. Total mercury in mushrooms and underlying soil substrate from the Borecka Forest, Northeastern Poland. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **42**, 145–154 (2002).
31. Kalaci, P. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem.* **69**, 273–281 (2000).
32. Kalač, P. Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: A review for the period 2000-2009. *Food Chem.* **122**, 2–15 (2010).
33. Isildak, O., Turkekul, I., Elmastas, M. & Aboul-Enein, H. Y. Bioaccumulation of heavy metals in some wild-grown edible mushrooms. *Anal. Lett.* **40**, 1099–1116 (2007).
34. Türkmen, M. & Budur, D. Heavy metal contaminations in edible wild mushroom species from Turkey's Black Sea region. *Food Chem.* **254**, 256–259 (2018).
35. Sarikurkcu, C., Tepe, B., Kocak, M. S. & Uren, M. C. Metal concentration and antioxidant activity of edible mushrooms from Turkey. *Food Chem.* **175**, 549–555 (2015).



36. Falandysz, J., Chudzińska, M., Barańkiewicz, D., Drewnowska, M. & Hanć, A. Toxic elements and bio-metals in *Cantharellus* mushrooms from Poland and China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**, 11472–11482 (2017).
37. Zhu, F. *et al.* Assessment of heavy metals in some wild edible mushrooms collected from Yunnan Province, China. *Environ. Monit. Assess.* **179**, 191–199 (2011).
38. Falandysz, J., Drewnowska, M., Chudzińska, M. & Barańkiewicz, D. Accumulation and distribution of metallic elements and metalloids in edible *Amanita fulva* mushrooms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **137**, 265–271 (2017).
39. Kojta, A. K. & Falandysz, J. Metallic elements (Ca, Hg, Fe, K, Mg, Mn, Na, Zn) in the fruiting bodies of *Boletus badius*. *Food Chem.* **200**, 206–214 (2016).
40. Falandysz, J., Krasinska, G., Pankavec, S. & Nnorom, I. C. Mercury in certain boletus mushrooms from Poland and Belarus. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **49**, 690–695 (2014).
41. Lazaro García, A. El aprovechamiento micológico como vía de desarrollo rural en España: las facetas comercial y recreativas. *An. Geogr.* **28**, 111–136 (2008).
42. Thomé Ortiz, H. Turismo micológico. Una nueva mirada al bosque. **1**, 1–15 (2015).
43. Ostos, C., Pérez-Rodríguez, F., Arroyo, B. M. & Moreno-Rojas, R. Study of mercury content in wild edible mushrooms and its contribution to the Provisional Tolerable Weekly Intake in Spain. *J. Food Compos. Anal.* **37**, 136–142 (2015).
44. Alonso, J., García, M. A., Pérez-López, M. & Melgar, M. J. The Concentrations and Bioconcentration Factors of Copper and Zinc in Edible Mushrooms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **42**, 180–188 (2003).
45. Melgar, M. J., Alonso, J. & García, M. A. Mercury in edible mushrooms and underlying soil: bioconcentration factors and toxicological risk. *Sci. Total Environ.* **407**, 5328–34 (2009).
46. Campos, J. A., Tejera, N. A. & Sánchez, C. J. Substrate role in the accumulation of heavy metals in sporocarps of wild fungi. *BioMetals* **22**, 835–841 (2009).
47. Campos, J. A. & Tejera, N. A. Bioconcentration factors and trace elements bioaccumulation in sporocarps of fungi collected from quartzite acidic soils. *Biol. Trace Elem. Res.* **143**, 540–554 (2011).
48. Kosanić, M., Ranković, B., Rančić, A. & Stanojković, T. Evaluation of metal concentration and antioxidant, antimicrobial, and anticancer potentials of two edible mushrooms *Lactarius deliciosus* and *Macrolepiota procera*. *J. Food Drug Anal.* **24**, 477–484 (2016).
49. Mleczek, M. *et al.* Accumulation of elements by edible mushroom species: Part I. Problem of trace element toxicity in mushrooms. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **48**, 69–81 (2013).
50. Polanco Zambrano, D. A. Níscalo o rebollón, *Lactarius deliciosus*. Características, dónde encontrarlo. *Paradais Sphynx* (2017). Available at: <https://naturaleza.paradais-sphynx.com/fungi/niscallo-rebollon-lactarius-deliciosus.htm>. (Accessed: 10th July 2019)
51. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. (CENGAGE Learning, 2015).
52. Skoog, D. A., Holler, Fj. & Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*. (Brooks/Cole, 2008).
53. Thomas, R. *Practical Guide to ICP-MS*. (Marcel Dekker, Inc., 2004).



54. Wang, X., Liu, H., Zhang, J., Li, T. & Wang, Y. Evaluation of heavy metal concentrations of edible wild-grown mushrooms from China. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* **52**, 178–183 (2017).
55. Müller, E. I., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Korn, M. das G. A. & Flores, É. M. M. Wet Digestion Using Microwave Heating. in *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination* 99–142 (Elsevier B.V., 2014). doi:10.1016/B978-0-444-59420-4.00004-0
56. de Castro, M. D. L. & García, J. L. L. Microwave-assisted solid sample treatment. in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* **24**, 179–232 (Elsevier, 2002).
57. Yung-chang, S., Po-hisang, C. & Mei-yun, S. Comparison of Different Digestion Methods for Total Decomposition of Diliceous and Organic Environmental Samples. *Anal. Sci.* **17**, 1395–1399 (2001).
58. Sacristán Moraga, D. Tesis Doctoral: Evaluación de la toxicidad y de la bioacumulación del Cu en un cultivo acumulador (*Lactuca sativa* L.) y otro no-acumulador (*Solanum lycopersicum* L.) en suelos agrícolas mediterráneos representativos, como base para la propuesta de estrategias de gestión. (Universidad de Valencia, 2015).
59. Soylak, M., Saraçoğlu, S., Tüzen, M. & Mendil, D. Determination of trace metals in mushroom samples from Kayseri, Turkey. *Food Chem.* **92**, 649–652 (2005).
60. Sithole, S. C., Mugivhisa, L. L., Amoo, S. O. & Olowoyo, J. O. Pattern and concentrations of trace metals in mushrooms harvested from trace metal-polluted soils in Pretoria, South Africa. *South African J. Bot.* **108**, 315–320 (2017).
61. Assad, M. *et al.* Mercury uptake into poplar leaves. *Chemosphere* **146**, 1–7 (2016).
62. Calzoni, G. L. *et al.* Active biomonitoring of heavy metal pollution using *Rosa rugosa* plants. *Environ. Pollut.* **149**, 239–245 (2007).
63. Engbersen, N. *et al.* Cadmium accumulation and allocation in different cacao cultivars. *Sci. Total Environ.* **678**, 660–670 (2019).
64. Grüter, R. *et al.* Long-term organic matter application reduces cadmium but not zinc concentrations in wheat. *Sci. Total Environ.* **669**, 608–620 (2019).
65. Pierart, A., Dumat, C., Maes, A. Q. M. & Sejalón-Delmas, N. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on antimony phyto-uptake and compartmentation in vegetables cultivated in urban gardens. *Chemosphere* **191**, 272–279 (2018).
66. Gunawardena, J., Egodawatta, P., Ayoko, G. A. & Goonetilleke, A. Role of traffic in atmospheric accumulation of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmos. Environ.* **54**, 502–510 (2012).
67. World Health Organization (WHO). *Guidelines for Drinking-water Quality*, vol.1, Recommendations, 3rd ed. World Health Organization. Geneva. (2008)
68. European Commission. *Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Copper*. Health and Consumer Protection Directorate - General. Brussels. (2003).
69. World Health Organization (WHO). *Evaluation of certain food additives and contaminants (Twenty-sixth report of the Joint of FAO/WHO Expert Committee of Food Additives)*. WHO Technical Reports Series, No. 637. Geneva. (1982).
70. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). *Recommended dietary allowances*. Ed. National Academy Press, (1989).
71. Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. National Academies. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese,*



*Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc.* (2001).





## 10. APÉNDICES

### APÉNDICE I

En este apartado se van a describir los perfiles toxicológicos de los cuatro metales que han sido objeto de estudio en el presente Trabajo Fin de Máster.

#### Plomo

El plomo es un metal pesado, azul-grisáceo y blando muy difundido en la corteza terrestre, encontrándose como mezcla de 3 isótopos (206, 207 y 208) en la naturaleza. Su forma más abundante es el sulfuro (PbS), aunque también forma compuestos orgánicos, como acetato, tetraetilo y tetrametilo e inorgánicos, como carbonato, cloruro, óxidos y silicato. Por su bajo punto de fusión fue uno de los primeros metales empleados por el hombre y su intoxicación crónica, el saturnismo, se conoce desde la antigüedad <sup>1</sup>. A nivel mundial, la principal fuente de exposición ha sido el uso de gasolina con plomo, la cual se ha ido restringiendo en los últimos años <sup>2</sup>. En el medio profesional, la exposición al plomo se produce en actividades de minería, fundiciones, fabricación y empleo de pinturas, baterías, tuberías, plaguicidas y envases con soldaduras de plomo <sup>1</sup>.

Aunque no suele producir intoxicaciones agudas, su acumulación en el organismo hace que la exposición a dosis bajas a largo plazo, en el medio laboral o a través del aire, el agua o los alimentos dé lugar a la expresión de una toxicidad crónica <sup>1</sup>. Los síntomas y gravedad de la intoxicación van a depender del tipo de compuesto de Pb. Por ejemplo, los compuestos organometálicos como el tetraetilo de plomo son más tóxicos que la forma inorgánica para los humanos, principalmente porque son liposolubles y por lo tanto penetran con mayor facilidad en el cuerpo, especialmente en el cerebro <sup>2</sup>.

Por lo general, el envenenamiento subletal por plomo se caracteriza por la aparición de defectos neurológicos, disfunción renal y anemia:

- **Defectos neurológicos:** Las disfunciones neurológicas vienen dadas debido a la similitud química del plomo con el calcio, lo que le permite interferir en diversas vías metabólicas de las mitocondrias, así como en los canales de Ca dependientes de voltajes, que intervienen en la neurotransmisión sináptica, a los que inhibe, y en las proteínas quinasas, las cuales activa. Esta interferencia con el Ca en las células endoteliales de los capilares cerebrales, produce una disrupción de la integridad de las uniones intercelulares fuertes que caracterizan a la barrera hematoencefálica, dando lugar a un edema cerebral <sup>1</sup>.
- **Disfunción renal:** Las alteraciones renales están relacionadas con disfunciones en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Se observan además cuerpos de inclusión nucleares formados por complejos Pb-proteína. El Pb disminuye la eliminación renal de ácido úrico produciendo la “gota saturnina” <sup>1</sup>.

- **Anemia:** La anemia se produce como resultado de dos efectos básicos: disminución de la longevidad de los glóbulos rojos y la inhibición de numerosas enzimas que intervienen en la síntesis de la hemoglobina <sup>3</sup>.

Así mismo, se han descrito alteraciones endocrinas y reproductivas con infertilidad en ambos sexos, abortos, prematuridad y anomalías congénitas. Aunque se comporta como carcinógeno en modelos experimentales, no hay evidencia de carcinogenicidad humana <sup>1</sup>.

---

## Cromo

El cromo (Cr) es un elemento químico de número atómico 24 que se encuentra en el grupo 6 de la tabla periódica, que se encuentra en estados de oxidación +2, +3, +6. La forma trivalente ( $\text{Cr}^{3+}$ ) constituye un oligoelemento esencial para el buen funcionamiento del organismo, puesto que es indispensable en el metabolismo de la glucosa, colesterol y ácidos grasos <sup>4</sup>, mientras que el cromo hexavalente ( $\text{Cr}^{6+}$ ) constituye una forma más importante toxicológicamente y es generada principalmente por procesos industriales <sup>5</sup>.

Los seres humanos están expuestos al Cr por vía inhalatoria (aire, humo del tabaco), vía cutánea o por vía oral (productos agrícolas, agua) y la toxicidad es debida a los derivados de  $\text{Cr}^{6+}$ . Al entrar en el organismo es distribuido a la médula ósea, pulmones, ganglios linfáticos, bazo, riñón e hígado <sup>4,5</sup>. El compuesto que más fácilmente se absorbe es el cromo VI, ya que es tomado por los eritrocitos e integrado a otras células por el sistema transportador de sulfatos. El  $\text{Cr}^{6+}$  se reduce a  $\text{Cr}^{3+}$  intracelularmente en las mitocondrias y el núcleo con ayuda de reductores intracelulares. La reducción intracelular genera intermediarios reactivos como cromo V, cromo IV y cromo III, así como radicales libres hidroxilo y oxígeno; estas formas reactivas del cromo son susceptibles de alterar el ADN. Se elimina un 60% por vía renal, en menor grado por heces (vía biliar), cabello, uñas, leche y sudor <sup>5</sup>.

El  $\text{Cr}^{6+}$  es conocido porque causa varios efectos sobre la salud: cuando se encuentra como compuesto en los productos de la piel, puede causar reacciones alérgicas, por ejemplo, erupciones cutáneas; después de ser respirado el  $\text{Cr}^{6+}$  puede causar irritación en el sistema respiratorio, daños en los pulmones y síntomas de tipo asmático. Otros problemas de salud causados por el  $\text{Cr}^{6+}$  son: malestar de estómago y úlceras, debilitamiento del sistema inmune, daño en los riñones e hígado, alteración del material genético, cáncer de pulmón y muerte <sup>5</sup>. Así pues, debido a que el  $\text{Cr}^{6+}$  induce alteraciones de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y reacciones cruzadas de la cadena de ADN, la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) lo clasifica como un carcinógeno del grupo I <sup>4</sup>.

---

## Cobre y Zinc

El zinc y el cobre son oligoelementos esenciales para la Biosfera, encontrándose presente en una gran variedad de células y tejidos. No sólo son nutrientes importantes, cofactores de numerosas enzimas



y factores de transcripción, sino que también actúan como mediadores intracelulares. Por sus funciones biológicas son de gran relevancia para el buen funcionamiento del organismo <sup>6</sup>.

En los organismos vivos el cobre se encuentra principalmente en forma cúprica ( $\text{Cu}^{2+}$ ), aunque también puede darse en otras formas catiónicas actuando como cofactor enzimático. En humanos sanos, la mayor parte del contenido de Cu está ligado a grupos prostéticos enzimáticos, al transporte de cobre o a las proteínas chaperonas. El cobre es necesario para la formación y el mantenimiento de la mielina, una capa protectora que cubre las neuronas, y participa en la formación del pigmento de melanina en la piel, el cabello y los ojos. Además, es un componente de un gran número de metaloenzimas involucradas en la formación de hemoglobina, metabolismo de carbohidratos, etc. También forma parte del complejo IV, que cataliza la reducción del oxígeno a agua, que constituye un paso esencial en el proceso de la respiración celular <sup>7</sup>. La deficiencia clínica de cobre puede ocasionar anemia (microcítica, normocítica o macrocítica) y neutropenia. Neurológicamente, puede manifestarse como mielopatía y neuropatía periférica simulando una degeneración combinada subaguda <sup>8</sup>. Otras afecciones con presentaciones similares incluyen infecciones, autoinmunidad, deficiencia de B12, deficiencia de folato, síndrome mielodisplásico, anemia aplásica y linfoma con compromiso de la médula ósea <sup>8</sup>. Las manifestaciones hematológicas, pero no neurológicas, responden rápidamente al reemplazo de cobre, por lo que el diagnóstico temprano es esencial para un buen resultado. Los factores de riesgo comunes para la deficiencia de cobre son la cirugía del tracto digestivo, la deficiencia dietética, las enteropatías con malabsorción y la nutrición intravenosa prolongada (nutrición parenteral total) <sup>8</sup>.

El zinc es uno de los metales de transición más abundantes que se encuentra en los organismos vivos principalmente en su forma divalente ( $\text{Zn}^{2+}$ ). Juega un papel fundamental en las células ya que el zinc es un componente integral de una gran variedad de enzimas y participa en el metabolismo de proteínas, lípidos y ácidos grasos. Además, el Zn actúa apoyando al sistema inmunitario interviniendo en la cicatrización de heridas, ayuda a mantener el sentido del gusto y del olfato, y es vital para el crecimiento y desarrollo normal del feto durante el embarazo <sup>6</sup>. La deficiencia del zinc en el organismo puede ser debida a causas hereditarias que impliquen dificultades en su absorción o bien puede manifestarse por una disminución en la ingesta <sup>9</sup>. Los síntomas en la deficiencia de zinc incluyen retraso en el crecimiento, pérdida de cabello, diarreas, impotencia, lesiones en ojos y piel, pérdida de apetito y retraso en la cicatrización de heridas <sup>6</sup>.

A pesar de que la mayoría de los datos demuestran que la deficiencia de estos dos metales esenciales es crucial para el organismo, las situaciones tóxicas derivadas de la sobreexposición a estos pueden dar lugar a efectos negativos para la salud humana. La toxicidad por Zn se ha observado tanto en forma aguda como crónica, produciendo dolor epigástrico, diarreas, náuseas y vómitos. Por otro lado, la sobrecarga de Cu afecta a una amplia variedad de funciones de las membranas, proteínas citosólicas y orgánulos subcelulares <sup>3</sup>.

## Referencias

1. Ferrer, A. *Intoxicación por metales. Anales del Sistema Sanitario de Navarra* **26**, 141–153 (2003).
2. Carpenter, D. O. *Effects of metals on the nervous system of humans and animals. International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* **14**, 209–218 (2001).
3. Espada Bellido, E. Tesis Doctoral: Diseño y Optimización de Nuevos Sistemas de Análisis de Metales Pesados en Aguas mediante Voltamperometría de Redisolución Adsorptiva y Sensores Ópticos. (Universidad de Cádiz, 2010).
4. Expuesta, U. P., Cuberos, E., Rodríguez, A. I. & Prieto, E. Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá, Colombia. *Rev. Salud Pública* **11**, 278–289 (2009).
5. Molina Montoya, N., Aguilar Casas, P. & Cordovez Wandurraga, C. Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Cienc. y Tecnol. para la Salud Vis. y Ocul.* **8**, 77–88 (2010).
6. Cai, L., Li, X.-K., Song, Y. & Cherian, M. Essentiality, Toxicology and Chelation Therapy of Zinc and Copper. *Curr. Med. Chem.* **12**, 2753–2763 (2005).
7. Gaetke, L. M., Chow-Johnson, H. S. & Chow, C. K. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology* **88**, 1929–1938 (2014).
8. Wazir, S. M. & Ghobrial, I. Copper deficiency, a new triad: anemia, leucopenia, and myeloneuropathy. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.* **7**, 265–268 (2017).
9. Maxfield, L. & Crane, J. S. *Zinc Deficiency. StatPearls* (2019).

Tabla A1. Muestras de *Lactarius deliciosus* y suelos.

<b><i>Muestras</i></b>					
<b><i>L.</i></b> <b><i>deliciosus</i></b>	<b>Suelos</b>	<b>Localización</b>	<b>No.</b> <b>Ejemplares</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>
<b><i>L-1</i></b>	<b><i>S-1</i></b>	Reserva Natural de Bouhachem (Marruecos)	20	35° 16' 8,2"	5° 26' 7,4"
<b><i>L-2</i></b>	<b><i>S-2</i></b>	Inmediaciones a Chefchaouen (Marruecos)	26	35° 4' 36,9"	5° 13' 49,5"
<b><i>L-3</i></b>	<b><i>S-3</i></b>	Pinar de la Dehesa de las Yeguas (Puerto Real)	16	36° 33' 25,4"	6° 7' 54,8"
<b><i>L-4</i></b>	<b><i>S-4</i></b>	Pinar del Rey (San Roque)	18	36° 14' 6,3"	5° 23' 55,9"
<b><i>L-5</i></b>	<b><i>S-5</i></b>	Pinar del Colorado (Conil de la Frontera)	13	36° 20' 13,9"	6° 5' 45,9"
<b><i>L-6</i></b>	<b><i>S-6</i></b>	Sendero del Palancar (Parque Natural de los Alcornocales)	19	36° 14' 50,5"	5° 33' 39,9"
<b><i>L-7</i></b>	<b><i>S-7</i></b>	Jimena de la Frontera (Sierra de Cádiz)	14	36° 26' 23,2"	5° 27' 31,0"

## APÉNDICE III

### Código Fuente: Script en Python 3 contenido metálico en suelos

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

# set width of bar
barWidth = 0.2

# set height of bar
cr = [11.1, 96.3, 13.14, 49.3, 40.5, 26.8, 20.4]
cr_error = [0.40, 2.10, 0.30, 0.50, 0.30, 0.40, 0.60]
cu = [2.37, 21.6, 6.69, 4.14, 5.07, 6.44, 4.58]
cu_error = [0.10, 0.30, 0.28, 0.03, 0.08, 0.05, 0.03]
zn = [10.7, 82.2, 12.2, 20.2, 22.6, 22.3, 19.1]
zn_error = [0.10, 0.40, 0.80, 0.80, 0.40, 0.60, 0.30]
pb = [6.38, 17.3, 14.8, 9.11, 19.9, 13.7, 8.82]
pb_error = [0.03, 0.10, 0.10, 0.07, 0.30, 0.10, 0.06]

# Set position of bar on X axis
r1 = np.arange(len(cu))
r2 = [x + barWidth for x in r1]

# Make the plot
plt.bar(r1, cu, yerr=cu_error, capsize=6, ecolor="black", color='#ff001e', width=barWidth,
edgecolor='white', label='Cu')
plt.bar(r2, cr, yerr=cr_error, capsize=6, ecolor="black", color='#00ff1e', width=barWidth,
edgecolor='white', label='Cr')
plt.bar(r3, zn, yerr=zn_error, capsize=6, ecolor="black", color='#0022ff', width=barWidth,
edgecolor='white', label='Zn')
plt.bar(r4, pb, yerr=pb_error, capsize=6, ecolor="black", color='#ff8c00', width=barWidth,
edgecolor='white', label='Pb')

# Add xticks on the middle of the group bars
```



```
#plt.xlabel('group', fontweight='bold')
plt.xticks([r + barWidth for r in range(len(cu))], ['S-1', 'S-2', 'S-3', 'S-4', 'S-5', 'S-6', 'S-7'])
plt.ylabel('mg/kg')

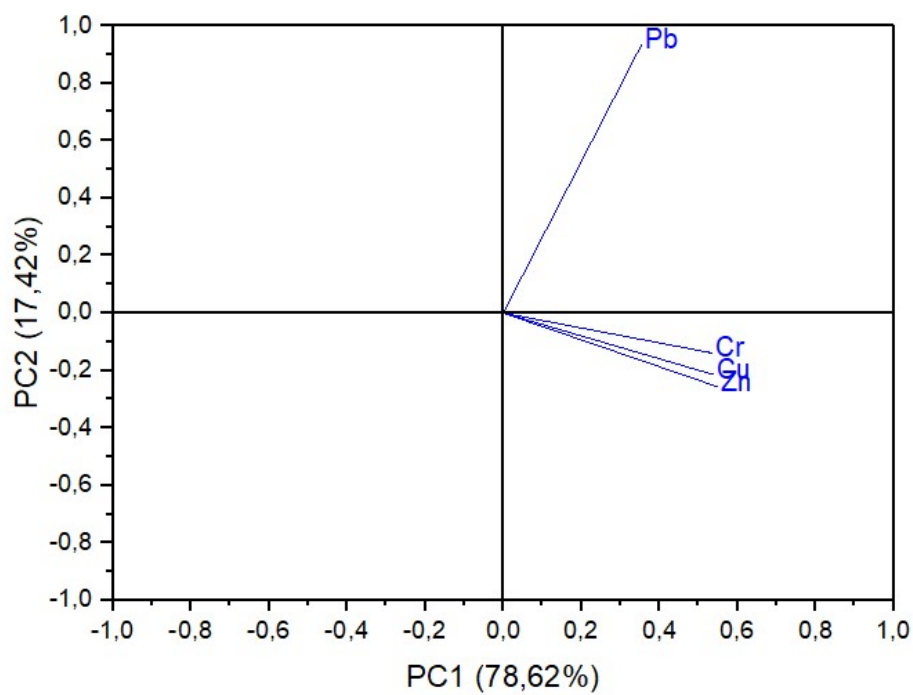
# Create legend & Show graphic
plt.legend()
plt.show()
```

## APÉNDICE IV

### Matriz de correlación del Análisis de Componentes Principales (ACP)

**Tabla A2.** Matriz de correlación del análisis de componentes principales (ACP).

	Cr	Cu	Zn	Pb
Cr	1	<b>0,8522</b>	<b>0,9306</b>	0,5103
Cu	<b>0,85215</b>	1	<b>0,9664</b>	0,49702
Zn	<b>0,9306</b>	<b>0,9664</b>	1	0,4597
Pb	0,5103	0,4970	0,4597	1



**Figura A.** Gráfico de influencias obtenido en el análisis de componentes principales (ACP).

## APÉNDICE V

### Código Fuente: Script en Python 3 para metales en setas

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

# set width of bar
barWidth = 0.2

# set height of bar
cr = [7.70, 8.85, 3.38, 4.14, 6.16, 0.944, 3.15]
cr_error = [1.38, 0.15, 0.007, 0.17, 0.10, 0.03, 0.57]
cu = [3.94, 6.24, 9.45, 8.13, 5.07, 13.0, 9.09]
cu_error = [0.04, 0.12, 0.19, 0.37, 0.09, 0.20, 0.96]
zn = [61.7, 79.8, 101.0, 102.0, 48.7, 132.0, 90.5]
zn_error = [0.05, 0.20, 1.0, 8.0, 0.20, 4.0, 0.90]
pb = [0.20, 0.64, 0.19, 0.15, 0.31, 0.07, 0.15]
pb_error = [0.05, 0.01, 0.002, 0.003, 0.01, 0.00, 0.04]

# Set position of bar on X axis
r1 = np.arange(len(cu))
r2 = [x + barWidth for x in r1]

# Make the plot
plt.bar(r1, cu, yerr=cu_error, capsize=6, ecolor="black", color='#ff001e', width=barWidth,
edgecolor='white', label='Cu')
plt.bar(r2, cr, yerr=cr_error, capsize=6, ecolor="black", color='#00ff1e', width=barWidth,
edgecolor='white', label='Cr')
plt.bar(r3, zn, yerr=zn_error, capsize=6, ecolor="black", color='#0022ff', width=barWidth,
edgecolor='white', label='Zn')
plt.bar(r4, pb, yerr=pb_error, capsize=6, ecolor="black", color='#ff8c00', width=barWidth,
edgecolor='white', label='Pb')

# Add xticks on the middle of the group bars
```

```
#plt.xlabel('group', fontweight='bold')  
plt.xticks([r + barWidth for r in range(len(cr))], ['L-1', 'L-2', 'L-3', 'L-4', 'L-5', 'L-6', 'L-7'])  
plt.ylabel('mg/kg')  
  
# Create legend & Show graphic  
plt.legend()  
plt.show()
```